

**PENGARUH TERAPI PREVENTIF MADU HUTAN SUMBAWA
TERHADAP AKTIVITAS PROTEASE DAN
HISTOPATOLOGI LAMBUNG
TIKUS (*Rattus norvegicus*)
YANG DIINDUKSI
PLUMBUM (Pb)**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:

CINDY OKTATI KASARI

135130101111058



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**Pengaruh Terapi Preventif Madu Hutan Sumbawa Terhadap
Aktifitas Protease dan Histopatologi Lambung Tikus
(*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi
Plumbum (Pb)**

**Oleh :
CINDY OKTATI KASARI
135130101111058**

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 20 Desember 2017
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

Prof. Dr. Ir. Chanif Mahdi, MS
NIP. 19520412 198002 1 001

drh. Nurina Titisari, M.Sc
NIP. 19860122 20150 2 001

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES
NIP. 19600903 198802 2 001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : Cindy Oktati Kasari

NIM : 135130101111058

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Penulis Skripsi Berjudul:

Pengaruh Terapi Preventif Madu Hutan Sumbawa Terhadap Aktivitas Protease Dan Histopatologi Lambung Tikus (*Rattus norvegicus*) Yang Diinduksi Plumbum (Pb)

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dan skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 20 Desember 2017

Yang menyatakan,

(Cindy Oktati Kasari)

NIM. 135130101111058

DAFTAR RIWAYAT HIDUP



PERSONAL DETAIL

Name	Cindy Oktati Kasari
Place of birth	Malang
Date of birth	October, 19 ^h 1995
Gender	Female
Religion	Islam
Marital Status	Single
Address 1	Jl. Ikan Gurami no.7 RT.04 RW.06 KEL. Tunjungsekar Kec.Lowokwaru Kode pos 65142 Malang
Phone (mobile)	081217793486
Email- Address	cindyoktati@yahoo.co.id
Nationality	Indonesian



FORMAL EDUCATION

Level	Place	Period
Kinder garten	Taman Kanak-Kanak (TK) Roudhotul Jannah Malang	2000-2002
Elementary School	SDN Tunjungsekar III Malang	2002-2008
Junior High School	SMP N 11 Malang	2008-2011
Senior High School	SMAK Frateran Malang	2011-2013
College	Fakultas Kedokteran Hewan UB, Malang	2013-2018

**Pengaruh Terapi Preventif Madu Hutan Sumbawa Terhadap
Aktivitas Protease dan Histopatologi Lambung Tikus
(*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi Plumbum (Pb)**

ABSTRAK

Pengaruh logam berat terhadap hewan dapat mengakibatkan punahnya suatu spesies yaitu melalui proses bioakumulasi. Logam berat yang masuk dalam tubuh terakumulasi dalam jaringan dan akan berdampak pada kerusakan atau menimbulkan perubahan bentuk maupun fungsi dari organel sel yang tergabung dalam jaringan. Madu Hutan Sumbawa merupakan salah satu madu dengan kualitas terbaik yang ada di Indonesia dan memiliki kandungan antioksidan berupa senyawa flavonoid yang berfungsi untuk menangkal radikal bebas. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh terapi preventif madu hutan Sumbawa terhadap aktivitas protease dan gambaran histopatologi lambung tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi plumbum (Pb). Penelitian ini dibagi 5 kelompok perlakuan, yaitu kontrol negatif, kontrol positif dengan pemberian Pb 10 mg/ekor/hari selama 14 hari, dan kelompok terapi preventif dengan madu hutan Sumbawa 25 mg/kg BB, 50 mg/kg BB dan 75 mg/kg BB selama 28 hari dan pemberian Pb dosis 10 mg/ekor/hari selama 14 hari. Setiap kelompok perlakuan terdiri dari 4 tikus. Aktivitas protease lambung dianalisa dengan uji Walter dan histologi lambung menggunakan uji deskriptif yaitu pewarnaan HE yang diamati menggunakan mikroskop BX51. Aktivitas protease dianalisa menggunakan uji *One Way* ANOVA dan dilanjutkan uji *Tukey* ($\alpha = 5\%$). Hasil penelitian menunjukkan bahwa madu hutan Sumbawa dosis 75 mg/kg BB mampu menghambat peningkatan aktivitas protease sangat signifikan ($p < 0,01$) yang ditunjukkan dengan menurunnya aktivitas protease sebesar $4,42 \times 10^{-2} \pm 0,0099 \mu\text{mol/mL}$ dengan penurunan aktivitas protease sebesar 31 % dan dapat memperbaiki epitel squamous simplek pada mukosa lambung.

Kata kunci: Plumbum (Pb), Aktivitas protease, Madu hutan Sumbawa, Lambung

The Preventive Effects of Sumbawa Forest Honey on Protease Activity and Gastric Histopathology of White Rats (*Rattus norvegicus*) Induced by Plumbum(Pb)

ABSTRACT

Effects of heavy metals to animals can result in extinction of a species that is through a process of bio accumulation. Heavy metals in the body accumulate in the tissues and will have an impact on damage or cause any change in the shape or function of the organelles of cells incorporated in the network. Sumbawa forest honey is one of the best quality that exists in Indonesia and has a content of antioxidants flavonoid compounds form that serves to ward off free radicals. This research aims to know the influence of preventive therapy Sumbawa forest honey against the activity of protease and gastric histopathology of rats (*Rattus norvegicus*) induced plumbum. This study divided 5 group, i.e., negative control, positive control by administering Plumbum 10 mg/head/day for 14 days, and preventive therapy groups with forest honey Sumbawa 25 mg/kg, 50 mg/kg and 75 mg/kg for 28 days and the granting of Plumbum a dose of 10 mg/head/day for 14 days. Each treatment group consists of 4 rats. Gastric protease activity is analyzed with the test of Walter and histology of gastric using coloring HE observed using a microscope BX51. The activity of the protease was analyzed using One Way test ANOVA and Tukey tests were resumed ($\alpha = 5\%$). The results showed Sumbawa forest honey therapy doses 3 more significantly ($p < 0,01$) decreased the activity protease level. Therapeutic group 3 with 75 mg/kg BB was able to inhibit protease that can decrease the protease activity by $4,42 \times 10^{-2} \pm 0,0099 \mu\text{mol/mL}$ with decreased activity protease by 31% and could repair histopathology of the epithelial squamous simplex cells on gastric mucosa.

Key words: Plumbum (Pb), Activity protease, Sumbawa forest honey, Gastric.

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT Tuhan Yang Maha Esa karena telah memberikan rahmat dan karunia-Nya sehingga Skripsi yang berjudul : Pengaruh Terapi Preventif Madu Hutan Sumbawa Terhadap Aktivitas Protease dan Histopatologi Lambung Tikus (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi Plumbum (Pb) telah selesai dilaksanakan. Sholawat serta salam semoga tetap dicurahkan kepada Nabi Muhammad SAW. Naskah skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan.

Dalam penyusunan skripsi ini penulis ingin mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Prof. Dr. Ir. Chanif Mahdi, MS selaku dosen pembimbing pertama atas bimbingan, kesabaran, fasilitas, dan waktu yang telah diberikan.
2. drh. Nurina Titisari, M.Sc sebagai dosen pembimbing kedua atas segala bantuan, kesempatan, nasihat, dan arahan yang diberikan tiada hentinya kepada penulis.
3. drh. Dodik Prasetyo, M.Vet selaku dosen penguji yang membantu dalam proses penelitian penulis hingga selesai.
4. drh. Albiruni Haryo, M. Sc selaku dosen penguji atas kritik dan saran yang diberikan kepada penulis.
5. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan yang selalu memberikan dukungan tiada henti demi kemajuan FKH UB tercinta.

6. Orangtua tercinta Handoko dan Tutik Heriyati, serta Kakak tercinta yang sangat istimewa dalam memberikan dukungan, bantuan, semangat, doa dan motivasi yang diberikan kepada penulis.
7. Seluruh teman di Kopi Everywhere, teman-teman kelompok penelitian Honeymoon yaitu Arnes Mardasella, Olenka Putri Windiarko, Diana Anggraeni dan Putri Stefy Graf yang senantiasa memberikan saran, kritik, motivasi semangat, inspirasi, bantuan, kebersamaan, keceriaan dan semua hal yang sangat luar biasa.
8. Semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian penulisan karya tulis ini yang tidak sempat disebutkan.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan skripsi ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis membuka diri untuk segala saran dan kritik yang membangun. Akhir kata, penulis berharap semoga Allah SWT membalas segala kebaikan yang telah diberikan dan Skripsi ini dapat memberikan manfaat dan wawasan tidak hanya bagi penulis namun juga bagi pembaca.

Malang, 20 Desember 2017

(Cindy Oktati Kasari)

DAFTAR ISI

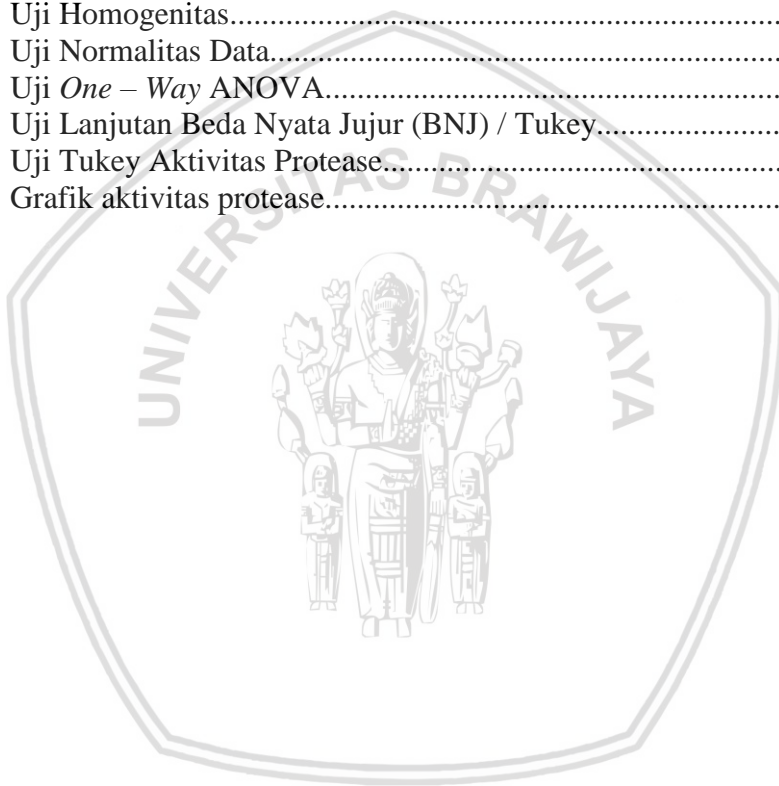
HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
LEMBAR PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG	xiii
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Batasan Masalah	5
1.4 Tujuan Penelitian	6
1.5 Manfaat Penelitian	6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1. Madu Hutan Sumbawa	7
2.2. Lambung	9
2.3. Enzim Protease	10
2.4. Plumbum	12
2.4.1 Mekanisme Plumbum	14
2.4.2 Pengaruh Plumbum terhadap Lambung	14
2.5. Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>)	15
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	
3.1 Kerangka Konseptual	18
3.2 Hipotesis Penelitian	21
BAB 4 METODE PENELITIAN	
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian	22
4.2 Alat dan Bahan Penelitian	22
4.2.1 Alat Penelitian	22
4.2.2 Bahan Penelitian	22
4.3 Tahapan Penelitian	23
4.3.1 Rancangan Penelitian	23
4.3.2 Penetapan Sampel Penelitian	24
4.3.3 Variabel Penelitian	24
4.4 Karakteristik Sampel Penelitian	25
4.4.1 Karakteristik Inklusi	25
4.4.2 Karakteristik Eksekusi	25
4.5 Prosedur Kerja	25
4.5.1 Persiapan Hewan Coba	25
4.5.2 Penentuan Dosis Madu	26
4.5.3 Pemberian Plumbum	26

4.5.4 Pengambilan Organ Lambung Tikus	27
4.5.5 Isolasi Protease	28
4.5.6 Pengukuran Aktivitas Protease	28
4.5.7 Histopatologi Lambung	30
4.5.7.1 Pembuatan Preparat dan Pewarnaan <i>Hematoxyline Eosin</i> (HE) Histopatologi Lambung	30
4.5.7.2 Pengamatan Histopatologi	32
4.6 Analisa Data.....	32
BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN	
5.1 Pengaruh Terapi Preventif Madu Hutan Sumbawa Terhadap Aktivitas Protease dan Histopatologi Lambung Tikus (<i>Rattus</i> <i>norvegicus</i>) yang Diinduksi Plumbum (Pb).....	33
5.2 Gambaran Histopatologi Lambung terhadap Pengaruh Terapi Preventif Madu Hutan Sumbawa yang Diinduksi Plumbum (Pb).....	39
BAB 6 PENUTUP	
6.1 Kesimpulan.....	44
6.2 Saran.....	44
DAFTAR PUSTAKA	45
LAMPIRAN	52



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1 Rancangan Kelompok Penelitian.....	23
5.1 Rata-Rata Aktivitas Protease Lambung Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>) pada Masing-Masing Perlakuan Penelitian.....	34
6.1 Absorbansi Larutan Standar Tirosin pada λ	63
6.2 Pembuatan Kurva Baku Tirosin.....	64
6.3 Data Aktivitas Protease.....	66
7.1 Uji Deskriptif.....	67
7.2 Uji Homogenitas.....	67
7.3 Uji Normalitas Data.....	68
7.4 Uji <i>One – Way</i> ANOVA.....	68
7.5 Uji Lanjutan Beda Nyata Jujur (BNJ) / Tukey.....	69
7.6 Uji Tukey Aktivitas Protease.....	70
7.7 Grafik aktivitas protease.....	70



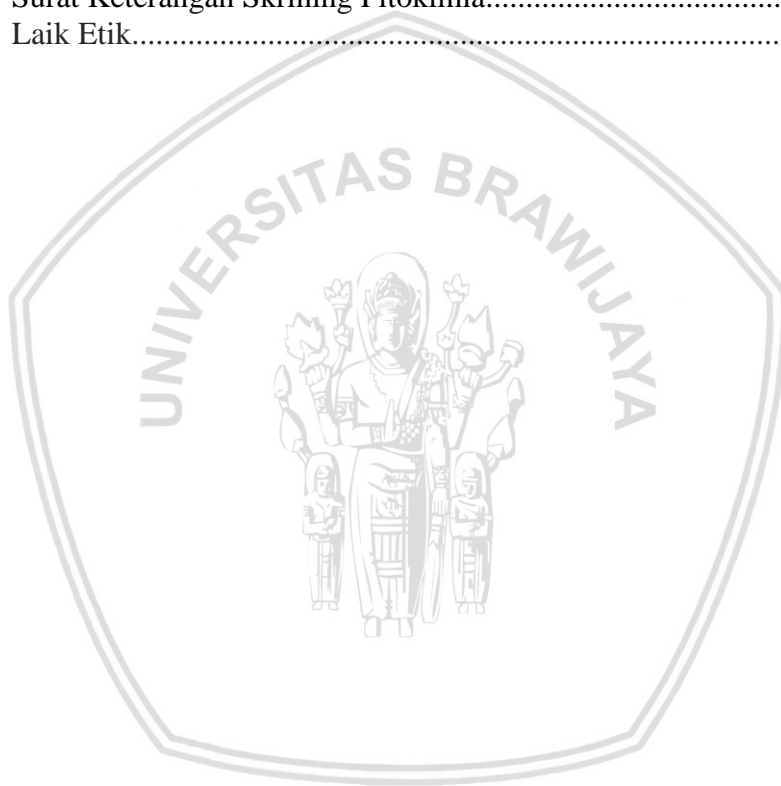
DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Anatomi Lambung.....	9
2.2 Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>).....	16
4.1 AnatomiLambungbagian <i>curvature major</i>	27
5.1 Histopatologi mukosa lambung tikus putih dengan pewarnaan Hematoxylin Eosin (HE), perbesaran 400x.....	39



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Kerangka Operasional.....	53
2. Perhitungan dosis Madu Hutan Sumbawa	54
3. Pemberian Plumbum.....	57
4. Isolasi Organ Lambung	58
5. Langkah Kerja Penelitian.....	59
6. Pengukuran Aktivitas Protease.....	63
7. Hasil Uji Statistik Aktivitas Protease Lambung.....	67
8. Surat Keterangan Skrining Fitokimia.....	71
9. Laik Etik.....	72



DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG

<u>Simbol/singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
%	: Persen
μm	: Mikrometer
ANOVA	: <i>Analysis of Variance</i>
BB	: Berat Badan
BNF	: <i>Buffer Neural Formalin</i>
BNJ	: Beda Nyata Jujur
cc	: Cubic Centimeter
cm	: Centimeter
DNA	: <i>Deoxyribose-nucleic acid</i>
Gr	: Gram
H	: Hidrogen
H ₂ O ₂	: Hidrogen Peroksida
HCl	: Hidrogen Klorida
HE	: <i>Hematoxylin Eosin</i>
kg	: Kilogram
L	: Liter
LD ₅₀	: <i>lethal dose</i>
LDL	: <i>low density lipoprotein</i>
m ³	: Meter kubik
mg	: Miligram
mL	: Mililiter
mm	: Milimeter
Na Thio	: <i>Sodium thiosulfate</i>
NaCl	: Natrium Chlorida
O ₂	: Oksigen
O ₂ ⁻	: <i>Superoksida</i>
°C	: Derajatcelcius
OH	: <i>Hidroksil</i>
Pb	: Plumbum
PBS	: <i>Phosphate Buffer Saline</i>
PFA	: <i>Peraformaldehida</i>
pH	: <i>Potential of Hydrogen</i>
ppm	: Part per million
RAL	: Rancangan Acak Lengkap

ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
rpm	: Revolutions per minute
TCA	: <i>Thichloroacetic acid</i>
α	: Alfa
μL	: Mikroliter



BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Era modern ini sumber pencemaran plumbum banyak ditemukan disekitar lingkungan kita, dapat berasal dari asap kendaraan bermotor, minuman, dan makanan. Sumber utama adanya plumbum di air berasal dari pembuangan limbah yang mengandung plumbum. Indonesia mempunyai nilai ambang batas plumbum untuk air bersih dan air minum berdasarkan Permenkes RI No. 416 tahun 1990 yaitu sebesar 0,05 mg/L (Fardiaz, 2001). Darmono (1995) menerangkan bahwa pengaruh logam berat terhadap makhluk hidup dapat mengakibatkan punahnya suatu spesies yaitu melalui proses bioakumulasi. Logam berat yang masuk dalam tubuh terakumulasi dalam jaringan dan berdampak pada kerusakan atau menimbulkan perubahan bentuk maupun fungsi dari organel sel yang tergabung dalam jaringan.

Salah satu alat pencernaan mengalami perubahan akibat paparan plumbum yang berlebihan adalah lambung. Organ ini terlibat dalam metabolisme zat makanan serta sebagian toksikan (Lu, 1995). Plumbum yang telah masuk ke dalam tubuh sebagian terakumulasi pada lambung. Plumbum dapat menyebabkan gastritis karena terdapat reaksi rangsangan plumbum terhadap mukosa sehingga menyebabkan pembengkakan dan inflamasi. Plumbum yang bereaksi dengan asam lambung diklorinasi menjadi garam larut sehingga dapat diabsorpsi oleh usus.

Dampak negatif paparan jangka panjang dari plumbum dapat memicu proses degeneratif progresif dari fisik dan otot seperti kelemahan otot, serta gangguan lain

seperti alergi, kerusakan ginjal, dan kehilangan berat badan (Jaishankar *et al.*, 2014). Plumbum juga dihubungkan dengan berbagai kejadian kanker, nefrotoksisitas, efek pada sistem saraf pusat, dan penyakit digestif. Selain itu, plumbum yang terinhalasi dapat menyebabkan penurunan *intelligence quotient* (IQ), penurunan stabilitas emosional, hiperaktivitas, dan penurunan pendengaran (Ibrahim *et al.*, 2012). Akumulasi plumbum didalam tubuh juga dapat berdampak pada kerusakan sistem hematopoetik, renal, sistem gastrointestinal, sistem imun, sistem muskuloskeletal, dan sistem kardiovaskuler (Lubis *et al.*, 2013). Gambaran makroskopis yang diakibatkan paparan plumbum yaitu pada gusi terdapat garis plumbum dengan menunjukkan indikasi ginggivitis yaitu deposit berwarna biru/hitam dari timbal sulfida. Pada ginjal terjadi inklusi intranuklir (pencangkupan inti) yang merupakan ginjal dalam kondisi tahan asam, terutama dalam sel-sel tubulus proksimal (terdiri dari bagian kompleks plumbum protein). Pada susunan tulang endapan plumbum yaitu radioopak (yang tidak dapat dilalui sinar-X), sehingga membentuk gambaran seperti piringan.

Secara selular, plumbum diketahui menyebabkan produksi berlebihan *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan dapat meningkatkan peroksidasi lipid, penurunan asam lemak jenuh, dan meningkatkan kandungan asam lemak tak jenuh pada membran sel (Ostrovskaya *et al.*, 2011). *Reactive Oxygen Species* yang dihasilkan oleh reaksi degeneratif jaringan menimbulkan efek pada metabolisme regular dengan merusak komponen sel. *Reactive Oxygen Species* juga menyebabkan reaksi membran lipid, protein, dan DNA (Ibrahim *et al.*, 2012). Selain itu, peningkatan ROS juga berimplikasi pada peningkatan radikal hidroksil (Videla, 2009). Pada konsentrasi yang tinggi, ROS

dapat menyebabkan kerusakan struktural pada sel, protein, asam nukleat, membran sel dan lipid, menyebabkan kondisi stres pada tingkat selular. Produksi ROS yang berlebihan mengaktifasi NF-KB dengan cara fosforilasi secara cepat dan degradasi sebagai proteasomal dari IKB α (protein inhibitor dari NF-KB). Selanjutnya, NF-KB bertranslokasi di nukleus untuk meregulasi sitokin pro-nflamasi, salah satunya TNF- α (Rosanna, 2012). TNF- α akan mengaktifkan neutrofil beserta makrofag. Neutrofil dan makrofag yang telah aktif akan memproduksi enzim protease. (Jaishankar *et al.*, 2014).

Dewasa ini antioksidan menjadi topik penting dalam berbagai disiplin ilmu. Khususnya dalam bidang kedokteran dan kesehatan, teori tentang senyawa radikal, radikal bebas dan antioksidan semakin berkembang. Menurut hasil penelitian bahwa sebagian besar penyakit diawali oleh reaksi oksidasi yang berlebihan di dalam tubuh. Seiring dengan bertambahnya pengetahuan tentang aktivitas radikal bebas, maka penggunaan senyawa antioksidan semakin berkembang dengan baik untuk makanan maupun untuk pengobatan (Boer, 2000). Antioksidan itu sendiri terdiri dari 2 macam yaitu eksogen dan endogen. Antioksidan endogen sendiri diperoleh dari sistem imunitas yang telah didapatkan sejak maternal, sedangkan antioksidan eksogen dapat diperoleh dari bahan alam sendiri yaitu tumbuhan, kacang-kacangan maupun madu.

Madu adalah salah satu penghasil antioksidan alami dan juga digunakan obat tradisional yang paling banyak dibuat uji klinisnya karena khasiatnya yang beraneka ragam (Lelo, 2008). Madu sebagai bahan berkhasiat obat sudah diketahui sejak zaman Yunani dan Mesir. Madu mengandung zat antibiotik yang berguna untuk membunuh bakteri patogen penyebab penyakit infeksi (Ilmiana, 2008).

Bangsa Yunani dan Mesir menggunakan madu untuk perawatan luka, dan sejumlah besar perawatan luka di dunia telah menggunakan madu yang belum diproses dari sumber yang berbeda-beda (Simon *et al.*, 2008). Madu mengandung hidrogen peroksida yang dapat diaktifkan melalui proses dilusi. Hidrogen peroksida ini nantinya akan bertindak sebagai antiseptik. pH asam pada madu (3,5-5,0) juga mencegah pertumbuhan bakteri (Sivasubramaniam, 2005).

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian madu hutan Sumbawa yang memiliki kemampuan antioksidan yaitu flavonoid untuk dijadikan terapi preventif dalam toksisitas plumbum. Induksi plumbum melalui oral akan mengakibatkan kerusakan pada lambung dan aktifnya sel – sel makrofag dan neutrofil yang akan memproduksi enzim protease, oleh karena itu penelitian ini menggunakan parameter protease dan gambabaran histopatologi lambung pada tikus putih (*Rattus novergicus*) sebagai indikator efek madu hutan Sumbawa dalam mencegah toksisitas plumbum.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana pengaruh terapi preventif madu hutan Sumbawa terhadap aktivitas protease pada tikus putih yang diinduksi dengan plumbum?
2. Bagaimana pengaruh terapi preventif madu hutan Sumbawa terhadap gambaran histopatologi lambung pada tikus putih yang diinduksi dengan plumbum?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang diuraikan, maka penelitian ini dibatasi pada :

1. Tikus putih (*Rattus novergicus*) yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih strain wistar sejumlah 20 ekor, berumur 8–10 minggu, berat badan rata-rata 200 gram yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Universitas Brawijaya Malang. Penggunaan hewan coba dalam penelitian ini sudah memperoleh sertifikat laik etik No: 790-KEP-UB dari Komisi Etik Penelitian (KEP) Universitas Brawijaya.
2. Madu hutan Sumbawa yang digunakan diperoleh dari Sumbawa yang diberikan selama 28 hari berturut – turut dengan dosis 25 mg/kg BB, 50 mg/kg BB, dan 75 mg/kg BB untuk masing – masing tikus putih pada setiap perlakuan.
3. Plumbum yang digunakan diperoleh dari toko bahan kimia Makmur Sejati kota Malang. Pemberian plumbum (Pb) diberikan sebanyak 10 mg/ekor/hari. Plumbum diberikan dalam bentuk serbuk (Pb asetat) yang dilarutkan dengan aquades dan diberikan selama 14 hari yang dimulai pada hari ke 15 – 28 (Suprijono dkk., 2011).
4. Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah aktivitas protease dan pengamatan histopatologi lambung diamati secara kualitatif menggunakan pewarnaan HE dan mikroskop *Olympus BX51*.

1.4 Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Mengetahui pengaruh terapi preventif madu hutan Sumbawa terhadap Aktivitas Protease tikus (*Rattus novergicus*) yang diinduksi plumbum (Pb).

2. Mengetahui pengaruh terapi preventif madu hutan Sumbawa terhadap histopatologi lambung tikus (*Rattus novergicus*) yang diinduksi plumbum (Pb).

1.5 Manfaat Penelitian

Melalui penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi kepada masyarakat tentang pemanfaatan madu hutan Sumbawa sebagai terapi preventif terhadap kerusakan lambung seperti gastritis sebagai akibat induksi plumbum



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Madu Hutan Sumbawa

Madu merupakan produk utama yang dihasilkan oleh lebah madu dari nektar yang diproses secara enzimatik, terdiri dari berbagai senyawa yang sangat berguna bagi tubuh. Komposisi dan sifat fisika kimia madu berbeda-beda pada setiap wilayah karena dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain jenis tanah, iklim dan jenis vegetasi (Buba *et al.*, 2013). Kualitas madu akan tetap terjaga dengan baik apabila disimpan secara benar yaitu hindarkan madu dari sinar matahari dan tempatkan di suhu ruang atau dingin (Kowalski *et al.*, 2013).

Sumbawa merupakan salah satu daerah penghasil madu yang cukup potensial di Indonesia. Madu yang dihasilkan dari Sumbawa didominasi oleh madu alam, yang dipanen langsung dari hutan alam Sumbawa. Kualitas madu yang berasal dari Dompu, Sumbawa dan Lombok Timur kandungan airnya sudah memenuhi SNI, yaitu dibawah 22% (Handoko, 2006). Waktu panen juga berpengaruh pada tingginya kadar air madu, apabila panen dilakukan pada musim penghujan, maka kadar air madu yang diperoleh akan semakin tinggi. Kadar air madu perlu diturunkan karena semakin rendah kadar air, kontaminasi semakin rendah, tingkat keawetan madu lebih terjaga.

Komponen madu terdiri dari karbohidrat, mineral, enzim, dan vitamin. Komponen terbesar madu terdiri dari karbohidrat (gula sederhana) dan air. Mutu madu di Indonesia diatur dalam Standar Nasional Indonesia (SNI) Nomor 01-3545-2013. Madu yang baik harus dapat memenuhi ketentuan yang ditetapkan oleh Standar Nasional Indonesia (SNI) 2013. Standar mutu madu yang berlaku di

Indonesia yang ditetapkan oleh Badan Standarisasi Nasional (BSN) sebagai acuan sehingga madu yang beredar di pasaran dapat terjamin mutu dan keamanannya.

Penggunaan madu hutan sebagai pencegahan lesi lambung yang diinduksi etanol oleh madu alami dan campuran glukosa-fruktosasukrosa-maltosa didapatkan penurunan jumlah dan derajat keparahan lesi perdarahan 98% (Hutagalung, 2008). Berdasarkan penelitian Jull, *et al.*, (2009) madu hutan yang dihasilkan oleh lebah *Apis dorsata* meningkatkan kemotaksis terhadap neutrofil dan memiliki aktivitas antitumor. Madu yang dihasilkan oleh *Apis dorsata* mampu memperbaiki waktu penyembuhan luka bakar superfisial ringan hingga sedang dibandingkan dengan beberapa pemakaian terapi konvensional. (Kucuk *et al.* 2007).

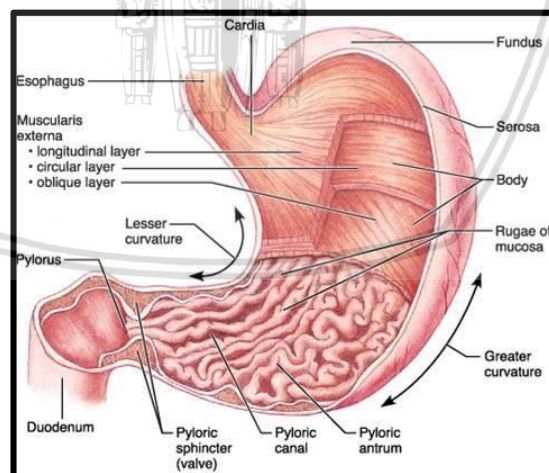
Madu dapat dibagi menurut asal nektar, maupun menurut bentuk madu yang umum terdapat dalam istilah pemasaran. Berbagai jenis madu dapat dihasilkan dari berbagai sumber nektar yang dikenal dengan nama sebagai berikut:

- a. Madu flora, madu yang dihasilkan dari nektar bunga. Bila nektar tersebut berasal dari beraneka ragam bunga, maka madu yang dihasilkan disebut madu poliflora dan bila dari satu jenis tanaman disebut madu monoflora.
- b. Madu ekstra flora, madu yang dihasilkan dari nektar yang terdapat diluar bunga yaitu dari bagian tanaman lain, seperti daun, cabang atau ranting.
- c. Madu embun, madu yang dihasilkan dari cairan hasil sekresi serangga Family *Lachanidae*, *Psyllidae* atau *Lechnidae* yang diletakkan eksudatnya pada bagian tanaman. Cairan ini kemudian dihisap dan dikumpulkan oleh lebah madu dibagian tertentu yang disebut sarang madu (Winarno, 2001).

2.2 Lambung

Lambung adalah organ endokrin-eksokrin campuran yang mencerna makanan dan mensekresi hormon. Lambung adalah bagian saluran cerna yang melebar dengan fungsi utama menambahkan cairan asam pada makanan yang masuk, mengubahnya melalui aktivitas otot menjadi massa kental (khimus) dan melanjutkan proses pencernaan yang telah dimulai dalam rongga mulut dengan menghasilkan enzim proteolitik pepsin. Lambung juga membentuk lipase lambung yang menguraikan trigliserida dengan bantuan lipase lingual (Junqueira *et al.*, 2007).

Lambung (ventrikulus) merupakan kantung yang terletak kiri rongga perut. Pada lambung, terdapat 3 bagian utama, yaitu bagian atas yang berbatasan dengan esofagus (kardiak), bagian tengah yang membulat (fundus), dan bagian paling bawah yang akan menuju usus (pilorus) dilihat pada **Gambar 2.1**.



Gambar 2.1 Anatomi Lambung Terdiri dari Kardiak, Fundus dan Pilorus (Junqueira *et al.*, 2007).

Bagian kardiak terletak dekat dengan organ hati, dan berhubungan dengan esofagus dan kerongkongan, sedangkan pilorus, berhubungan langsung dengan usus dua belas jari (duodenum). Pada masing-masing bagian (kardiak dan pilorus),

terdapat klep atau katup yang merupakan tempat keluar masuknya makanan pada lambung (Saktiyono, 2004).

Lambung memiliki 2 fungsi utama yaitu, fungsi pencernaan dan fungsi motorik. Fungsi pencernaan dan sekresi lambung berkaitan dengan pencernaan protein, sintesis dan sekresi enzim-enzim pencernaan. Fungsi motorik lambung, yaitu menyimpan makanan dalam jumlah besar sampai makanan tersebut dapat ditampung pada bagian bawah saluran pencernaan, mencampur makanan tersebut dengan sekret lambung sampai membentuk suatu campuran setengah padat yang dinamakan kimus, dan mengeluarkan makanan perlahan-lahan dari lambung masuk ke usus halus dengan kecepatan yang sesuai untuk pencernaan dan absorpsi oleh usus halus (Guyton dan Hall, 2007).

Mukosa lambung mengandung 2 tipe kelenjar tubular yang penting yaitu kelenjar oksintik (gastrik) dan kelenjar pilorik. Kelenjar oksintik terletak pada bagian fundus dan korpus lambung yang bertanggungjawab membentuk asam dengan mensekresikan mukus, asam hidroklorida (HCl), faktor intrinsik dan pepsinogen. Kelenjar pilorik berfungsi mensekresikan mukus untuk melindungi mukosa lambung, juga beberapa pepsinogen, renin, lipase lambung dan hormon gastrin (Guyton dan Hall, 2007).

2.3 Enzim Protease

Enzim mempunyai daya katalitik yang sangat tinggi, bekerja sangat spesifik terhadap substrat dan reaksi yang dikatalisis. Enzim mempunyai reaksi kimia tanpa mengubah keseimbangan reaksi yang dikatalisis (Sawhney and Singh, 2008). Aktivitas enzim dipengaruhi oleh konsentrasi enzim, konsentrasi substrat, suhu, pH

serta aktivator dan inhibitor. Untuk enzim pada hewan, suhu optimalnya antara 35°C-40°C pada suhu tubuh. Pada suhu di atas dan di bawah suhu optimalnya maka aktivitas enzim berkurang. Di atas 50°C, enzim bertahap menjadi inaktif karena protein terdenaturasi. Pada suhu 100°C, semua enzim aktivitasnya berkurang (Widhoretno, 2011).

Protease memegang peranan penting didalam banyak fungsi hayati, mulai dari tingkat sel, organ sampai organisme, yaitu dalam melangsungkan reaksi metabolisme. Protease merupakan enzim proteolitik yang mengkatalisis pemutusan ikatan peptida pada protein. Fungsi lain dari protease yaitu mengatur dan reaksi-reaksi yang menghasilkan sistem berantai (*cascade*) untuk menjaga normal homeostatis maupun kondisi patofisiologis abnormal serta proses kematian sel terprogram. Enzim protease selain diperlukan untuk degradasi protein nutrisi, enzim ini juga terlibat dalam sejumlah mekanisme patogenisitas, proses koagulasi darah, diferensiasi, sejumlah proses pasca translasi protein dan mekanisme ekspresi protein ekstraseluler (Rao *et al.*, 1998).

Enzim protease yang dihasilkan oleh neutrofil dan makrofag memiliki peran penting dalam reaksi inflamasi. Enzim ini disintesis dipermukaan membran plasma sehingga akan mengatur aktivitas kemokin, sitokin, dan reseptor permukaan sel. Sekresi dari protease juga mampu mengaktifkan limfosit, apoptosis dan adhesi molekul. Enzim protease yang berperan dalam inflamasi adalah enzim elastase, mampu menghancurkan bakteri dan sel-sel yang rusak. Enzim ini bekerja secara intraseluler di dalam fagolisosom untuk menghancurkan mikroorganisme patogen. Enzim protease mampu menginduksi sel yang rusak untuk melakukan apoptosis.

Apoptosis adalah suatu mekanisme kematian sel secara fisiologis yang bersifat menguntungkan bagi tubuh. Apoptosis akan mengeliminasi sel-sel yang memicu inflamasi sehingga mampu meredakan reaksi radang (Korkmaz dkk., 2010).

Protease merupakan salah satu enzim yang berperan dalam proses fagositosis terhadap benda asing dalam tubuh. Proses fagositosis dapat menstimulasi produksi ROS (*Reactive Oxygen Species*) secara berlebihan. Produksi ROS yang berlebihan mampu mengakibatkan terjadinya inflamasi pada jaringan. *Reactive Oxygen Species* adalah molekul yang terbentuk karena adanya reaksi reduksi pada oksigen yang dapat bersifat radikal. Sel inflamasi akan mensekresi sitokin proinflamasi sehingga mengaktifkan neutrofil. Neutrofil yang teraktivasi akan memperbanyak ROS dan melepaskan protease ke dalam sel dan jaringan (Wati dkk., 2013).

2.4 Plumbum

Polusi logam berat termasuk timbal (Pb) merupakan masalah yang serius di negara-negara maju maupun negara berkembang seperti Indonesia. Pencemaran lingkungan oleh timbal antara lain diakibatkan oleh penambangan dan industri yang menggunakan timbal. Pencemaran lingkungan oleh asap, debu, dan gas yang mengandung timbal berasal dari asap kendaraan bermotor serta pembuangan limbah pabrik baterai, cat, tekstil, juga buruknya sanitasi makanan, merupakan faktor yang menunjang untuk terjadinya keracunan timbal pada makhluk hidup. Khususnya bagi individu muda senyawa timbal sangat potensial merusak sistem saraf sehingga dapat disertai penurunan IQ (Hariono, 2005).

Plumbum merupakan zat berbahaya, apabila masuk ke dalam tubuh yang berasal dari pencemaran udara maupun air, dapat menyebabkan penurunan produktivitas, menghambat kerja enzim, menghambat penyerapan mineral oleh tubuh, dan menurunkan kadar antioksidan serta meningkatkan produksi radikal bebas. Ketidakseimbangan antara serangan oksidan dan pertahanan antioksidan pada jaringan dan sel mengarah pada terjadinya kerusakan organ (Wang Lin, 2010).

Akumulasi plumbum tertinggi dalam jaringan lunak terjadi berturut-turut pada ginjal disusul hati, otak, paru, jantung otot dan testis (Hariono, 2005). Logam Pb berpotensi menjadi bahan toksik jika terakumulasi di dalam organ makhluk hidup. Cemar logam ini dapat masuk ke dalam tubuh melalui saluran pencernaan, saluran pernafasan, dan kulit (Sudarwin, 2008). Adapun mekanisme kerusakan organ yang diakibatkan oleh plumbum adalah plumbum tingkat tertentu dapat menginduksi pembentukan radikal bebas dan menurunkan kemampuan sistem antioksidan tubuh sehingga dengan sendirinya akan terjadi stres oksidatif (Gurer *et al.*, 2000).

Plumbum yang dilepaskan ke lingkungan akan sangat reaktif. Logam ini akan bereaksi cepat dengan oksigen dan karbondioksida yang ada di udara. Ketika dicampur dengan asam sulfat, plumbum akan membentuk $PbSO_4$ yang nantinya akan menghasilkan lapisan yang sangat kuat sehingga sering digunakan sebagai pembungkus kabel, pelindung atap, tangki dan pipa yang terbuat dari asam sulfat (Angkat, 2008).

2.4.1 Mekanisme Plumbum

Konsentrasi logam berat pada hewan karnivora lebih besar daripada hewan herbivora dan konsentrasi pada hewan herbivora lebih besar daripada tanaman. Semakin tinggi tingkat piramida makanan maka akan semakin besar akumulasi plumbum di dalam tubuh. Intoksikasi yang kronis dan akumulasi yang terjadi secara terus menerus tanpa dilakukan tindakan apapun dapat menyebabkan gangguan syaraf dan gangguan pencernaan (Irina dkk, 2011).

Bentuk kimia Pb merupakan faktor penting yang mempengaruhi sifat-sifat plumbum di dalam tubuh. Komponen Pb organik, misalnya tetraetil Pb, segera dapat terabsorpsi oleh tubuh melalui kulit ataupun membran mukosa. Plumbum dalam bentuk larutan diabsorpsi sekitar 1-10% melalui dinding saluran pencernaan. Plumbum yang terakumulasi pada lambung akan dideposisi dan sebagian lagi didistribusikan oleh darah ke dalam jaringan. Plumbum kemudian dieksresikan melalui urin dan feses (Fardiaz, 2002).

2.4.2 Pengaruh Plumbum terhadap Lambung

Pada lambung, plumbum akan merusak bagian lumen. Absorpsi plumbum pada lambung dapat meningkat dengan adanya penurunan pH dan perubahan lapisan mukosa. Nilai pH lambung dapat naik turun sehubungan dengan stres. Keadaan ini akan memfasilitasi konversi senyawa trietil plumbum menjadi dietil plumbum dan monoetil plumbum sehingga lebih cepat diserap oleh saluran gastrointestinal (Hariono, 2006). Mekanisme ionik dari toksisitas plumbum terutama karena kemampuan plumbum dalam menggantikan tempat kation bivalen seperti Ca^{2+} , Mg^{2+} dan kation monovalen yang secara langsung dapat mengganggu metabolisme biologis dari sel (Jaishankar *et al.*, 2014). Mekanisme ionik dari

toksisitas plumbum menyebabkan perubahan signifikan pada berbagai proses biologis seperti adhesi sel, sinyal intraselular dan ekstraselular, mengganggu aktivitas protein, maturasi, apoptosis, transportasi ionik, regulasi enzim, dan pelepasan neurotransmitter. Dibawah pengaruh plumbum, level ROS meningkat dan level antioksidan menurun. Berbagai penelitian telah menunjukkan bahwa stres oksidatif pada sel disebabkan oleh ketidakseimbangan produksi radikal bebas dan peran antioksidan untuk mendetoksifikasi untuk memperbaiki kerusakan yang terjadi (Jaishankar *et al.*, 2014).

Organ lambung pada tikus yang terakumulasi oleh plumbum pada bagian rusak akan terlihat pada mukosa. Absorpsi plumbum pada lambung dapat meningkat dengan adanya penurunan pH dan perubahan lapisan mukosa. Nilai pH pada lambung dapat turun-naik sehubungan dengan stres. Rizkiani (2009) menyatakan bahwa ketika terjadi iritasi pada lambung maka kerusakan patologi yang mungkin tampak secara mikroskopis adalah adanya pengelupasan sel-sel epitel permukaan atau disebut dengan erosi sel epitel dan ditemukannya hemoragi, sedangkan yang tampak secara makroskopis adalah hemoragi atau hiperemi ringan disertai dengan adanya edema.

2.5 Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian yaitu tikus putih (*Rattus norvegicus*), hewan ini termasuk hewan nokturnal (aktif di malam hari) dan sosial. Salah satu faktor yang mendukung kelangsungan hidup tikus putih dengan baik ditinjau dari segi lingkungan adalah temperatur dan kelembapan. Temperatur yang

baik untuk tikus putih yaitu 19°C-23°C, dengan kelembapan 40-70% (Wolfenshon dan Lloyd, 2013).



Gambar 2.2 Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) (Junqueira *et al.*, 2007).

Menurut Koolhas (2010) hewan coba tikus jantan dapat mencapai berat 800 gram dalam kondisi obesitas. Ukuran dari tikus putih dapat dipengaruhi dari temperatur selama pemeliharaan. Tikus putih dapat hidup hingga 600 hari pada tikus jantan dan 700 hari pada tikus betina. Karakteristik lain dari tikus putih Galur Wistar yaitu kepala dan badan lebih pendek dari ekornya, hidung tumpul serta telinga kecil, berat badan antara 150-600 gram, panjang badan 18-25cm dan berumur 4-5 tahun dilihat pada **Gambar 2.2**. Tikus tidak memiliki empedu (Sirois, 2005).

Klasifikasi tikus putih menurut Sirois (2005), antara lain :

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mamalia
Ordo	: Rodentia
Famili	: Muridae
Genus	: Rattus

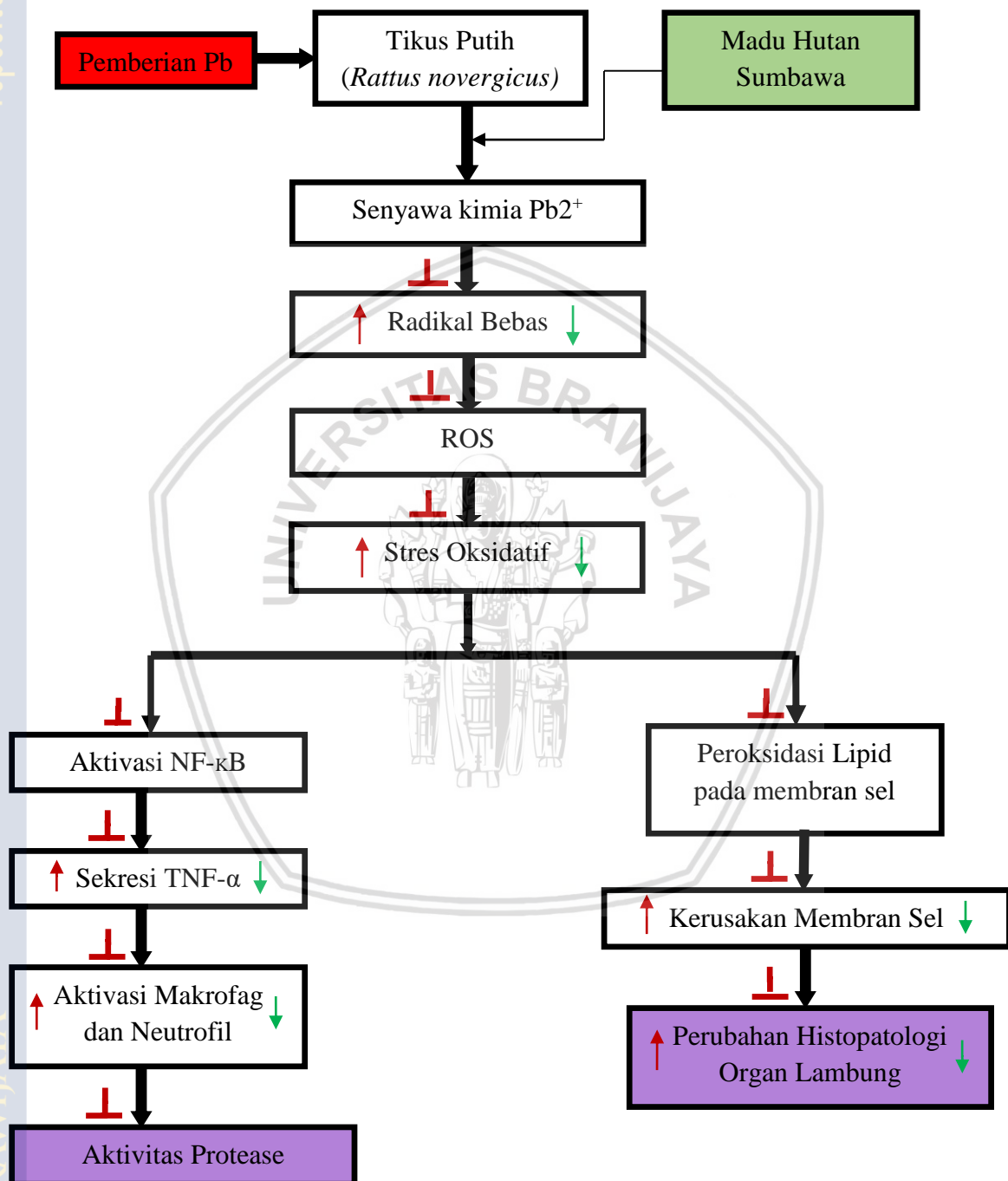
Spesies : *Rattus norvegicus*

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) memiliki kelebihan sebagai hewan coba diantaranya: tidak mudah muntah karena struktur anatomi yang tidak biasa pada esopHagus yang bermuara ke dalam empedu dan tidak mempunyai kantung empedu (Kusumawati, 2004). Tikus putih sebagai hewan percobaan relatif resisten terhadap infeksi dan sangat cerdas. Tikus putih tidak begitu bersifat fotofobik seperti halnya mencit dan kecenderungan untuk berkumpul dengan sesamanya tidak begitu besar. Aktivitasnya tidak terganggu oleh adanya manusia di sekitarnya. Tikus laboratorium jantan jarang berkelahi seperti mencit jantan. Tikus putih dapat tinggal sendirian dalam kandang dan hewan ini lebih besar dibandingkan dengan mencit, sehingga untuk percobaan laboratorium, tikus putih lebih menguntungkan daripada mencit (Ernawati, 2010).












BAB 3 KARANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

Keterangan :

	: Patomekanisme		: Penurunan		: Variabel bebas
	: Peningkatan		: Menghambat		: Variabel terikat
	: Hewan coba		: Terapi		: Paparan

Tikus putih Galur Wistar (*Rattus norvegicus*) diberikan madu hutan Sumbawa yang mengandung senyawa flavonoid sebagai terapi preventif untuk mencegah kerusakan organ dalam tubuh sebagai akibat dari pemberian plumbum (Pb). Madu mengandung bermacam-macam zat aktif yang berfungsi sebagai antioksidan (Weirich, 2001) antara lain flavonoid, vitamin C, asam organik, enzim, asam fenolat dan beta karoten yang bermanfaat sebagai antioksidan tinggi serta vitamin A, vitamin E yang juga merupakan salah satu vitamin antioksidan esensial yang utama (Parwata, 2010). Madu hutan Sumbawa memiliki kandungan antioksidan. Antioksidan madu hutan Sumbawa akan memberikan atom hidrogen kepada plumbum sehingga membentuk *chelate*. Reaksi antioksidan dari flavonoid yaitu mengikat radikal bebas dan menghambat pembentukan peroksidase lipid yang berperan sebagai *scavengers* (peredam).

Plumbum merupakan senyawa lipofilik sehingga dengan mudah akan berikatan dengan lipid dari membran sel dan akan membentuk peroksidasi lipid. Paparan dalam waktu lama akan mengakibatkan nekrosis dan kerusakan sel (Hidayat dkk, 2013). Plumbum yang telah diinduksi ke dalam tubuh hewan coba akan dimetabolisme dan berubah menjadi Pb^{2+} yang memiliki elektron tak berpasangan pada lapisan luarnya. Elektron tak berpasangan ini mengakibatkan Pb

menjadi radikal bebas dan berusaha untuk melengkapi lapisan terluar tersebut agar lebih stabil dengan cara menarik elektron dari molekul lainnya (Hidayat dkk., 2013).

Peningkatan radikal bebas dapat menyebabkan terbentuknya ROS. Disisi lain kondisi ROS yang meningkat akan mengakibatkan timbulnya stres oksidatif. Molekul lipid yang mengalami stres oksidatif akan mengalami auto-oksidasi atau lebih dikenal dengan peroksidasi lipid. Protein yang mengalami oksidasi menjadi tidak berfungsi dan DNA yang teroksidasi menjadi mutagen, karsinogen atau menyebabkan kematian sel. Produksi ROS yang berlebihan akan mengaktifasi NF- κ B dengan cara fosforilasi secara cepat dan degradasi sebagai proteasomal dari IKB α (protein inhibitor dari NF- κ B). Selanjutnya, NF- κ B akan bertranslokasi di nukleus untuk meregulasi sitokin pro-nflamasi, salah satunya TNF- α (Rosanna, 2012). TNF- α akan mengaktifkan neutrofil beserta makrofag. Neutrofil dan makrofag yang telah aktif akan memproduksi enzim protease, namun neutrofil dan makrofag yang terlalu aktif mampu merusak sel sehat yang berada di sekitar sel yang rusak. Hal itu meningkatkan resiko kerusakan sel yang semakin parah (Abbas dkk., 2015)

Menurut Srisook dkk (2012), Terbentuknya *chelate* akan menstabilkan Pb sehingga mencegah terjadinya kerusakan sel. Pembentukan *chelate* ini akan menyebabkan logam plumbum menjadi inaktif. Selain itu, plumbum tidak dapat menginisiasi terjadinya inflamasi karena kuersetin yang terdapat pada flavonoid mengganggu produksi TNF- α sebagai sitokin pro-inflamasi (Kelly, 2011). Inflamasi yang telah diminimalisir akan mengakibatkan aktivitas protease yang

disintesis oleh neutrofil dan makrofag mendekati normal. Keadaan stres oksidatif dan ROS juga turut menurun. Kerusakan membran sel juga turut dapat dicegah karena peroksidase lipid dapat ditekan, dengan demikian, perubahan gambaran histopatologi lambung dapat dicegah.

3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang telah ada, maka hipotesis yang dapat diajukan adalah sebagai berikut :

1. Madu hutan Sumbawa dapat mencegah peningkatan aktivitas protease dari lambung tikus (*Rattus novergicus*) yang diinduksi plumbum (Pb).
2. Madu hutan Sumbawa dapat mencegah kerusakan pada organ lambung sehingga mampu mencegah perubahan gambaran histopatologi organ lambung tikus (*Rattus novergicus*) yang diinduksi plumbum (Pb)



BAB 4 METODE PENELITIAN

1.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan 12 September 2017 sampai 16 Oktober 2017 di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Laboratorium Biokimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya, dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

1.2 Alat dan Bahan

1.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: kandang tikus berupa bak plastik dan tutup kandang dari kawat, botol minum tikus, sekam berupa parutan kayu halus, alat sonde, *dissecting set*, papan bedah, timbangan digital, sarung tangan, spuit 1 cc, spuit 3 cc, *microtube*, timbangan digital, gelas ukur, cawan petri, spatula, *objek glass*, *cover glass*, *beaker glass*, mortar dingin, autoclaf, mikroskop cahaya (*Olympus BX51*), *micropipette* ukuran 10-100 μL , mortar, tempat organ, *tissue*, kapas, kertas saring, *box* pakan, spektrofotometer, *timer*, pH meter, *micotube*, *hot plate*, inkubator dan lemari pendingin.

1.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus novergicus*) ras Wistar jantan, Pb asetat (*powder*), madu hutan Sumbawa, *PHospHate Buffer Saline* (PBS), *aquadest*, NaCl fisiologis 0,9% dingin, PBS-azida, pH 7,4, PFA 4%, PBS-Tween : PMSF (9:1), pasir kuarsa, balok es, etanol absolut dingin, Tris-HCl (1:1) pH 6,5, substrat kasein 1% asam trikloro asetat

(TCA) 4%, Na_2CO_3 0.5 M, pereaksi Follin Ciocalteau (1:2), *xylol* bertingkat, alkohol bertingkat, tirosin, PFA 4%, blok parafin, pewarna *Hematoxyline Eosin* (HE), alkohol 70%, alkohol 90%, dan alkohol 95%.

Pakan berupa pelet diberikan sebanyak 10% dari berat badan hewan coba (Widiartini dkk., 2013) yaitu sekitar 15-20 gram /ekor/hari. Pakan yang diberikan mengandung karbohidrat 5%, protein 10%, lemak 3%, serta vitamin, mineral, dan air 12% (AOAC, 2005)

1.3 Tahapan Penelitian

4.3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), dipergunakan apabila media yang digunakan dalam penelitian sama atau dianggap seragam (Kusriningrum, 2008). Rancangan kelompok penelitian dapat dilihat pada **Tabel 4.1**. Secara lengkap skema kelompok perlakuan dan skema kerja penelitian dilihat pada **Lampiran 1**.

Tabel 4.1. Rancangan Kelompok Penelitian

Kelompok	Keterangan	Variabel yang Diamati	
		Aktivitas Protease	Histopatologi Lambung
A (Kontrol negatif)	Pakan standar dan air minum		
B (Kontrol positif)	Pakan standar dan air minum + pemberian Pb 10 mg/ekor/hari		Terdapat kematian 1 ekor tikus
C (Terapi 1)	Pakan standar dan air minum + 25 mg/kg BB madu hutan Sumbawa + pemberian Pb 10 mg/ekor/hari		Terdapat kematian 1 ekor tikus

D (Terapi 2)	Pakan standar dan air minum + 50 mg/kg BB madu hutan Sumbawa + pemberian Pb 10 mg/ekor/hari		
E (Terapi 3)	Pakan standar dan air minum + 75 mg/kg BB madu hutan Sumbawa + pemberian Pb 10 mg/ekor/hari		

4.3.2 Penetapan Sampel Penelitian

Penentuan jumlah sampel minimal menggunakan rumus $p(n - 1) \geq 15$, dimana (p) adalah jumlah perlakuan dan (n) adalah jumlah ulangan (Kusriningrum, 2008), perhitungan banyaknya ulangan sebagai berikut.

$$p(n - 1) \geq 15$$

$$5(n - 1) \geq 15$$

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Penelitian ini memiliki lima perlakuan, dengan dasar rumus di atas diperoleh jumlah pengulangan sebanyak lebih dari atau sama dengan empat kali. Jumlah pengulangan yang diambil adalah empat, sehingga sampel yang diperoleh pada penelitian ini sebanyak 20 ekor tikus putih jantan (*Rattus novergicus*).

4.3.3. Variabel Penelitian

Adapun variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah :

- Variabel bebas : Dosis plumbum (Pb) dan dosis madu hutan Sumbawa
- Variabel terikat : Aktivitas protease dan histopatologi lambung tikus putih

c. Variabel kontrol :

- Tikus putih (*Rattus novergicus*) meliputi jenis kelamin, umur, berat badan, strain Wistar.
- Madu hutan Sumbawa yang berwarna coklat keemasan dan konsistensi kental.
- Pakan yang digunakan yaitu sebanyak 10% dari berat badan tikus yaitu 15-20 gram.
- Suhu ruangan yang digunakan 26–27°C

1.4 Karakteristik Sampel Penelitian

1.4.1 Karakteristik Inklusi

- a. Tikus putih jantan (*Rattus novergicus* strain Wistar) umur 8–10 minggu
- b. Berat badan rata-rata 200 gram
- c. Jenis kelamin jantan
- d. Sehat, ditandai dengan gerak yang aktif dan mata yang jernih

1.4.2 Karakteristik Eksklusi

- a. Tikus yang mati dalam perjalanan penelitian atau mengalami sakit

1.5 Prosedur Kerja

1.5.1 Persiapan Hewan Coba

Persiapan hewan coba dimulai dengan diaklimatisasi hewan coba selama 7 hari di laboratorium. Pemberian pakan selama masa adaptasi berupa pakan sesuai kebutuhan yaitu 20 gram/ekor/hari (10% dari berat badan) dan air minum diberikan secara *ad libitum*. Hewan coba sebanyak 20 ekor dibagi dalam 5

kelompok perlakuan secara acak. Setiap kelompok hewan coba terdiri dari masing-masing 4 ekor hewan coba. Tikus dikandangkan sesuai kelompok perlakuan dan dipelihara pada ruang bersuhu 26–27°C dengan kelembaban ruang 83% (Lina dkk., 2003).

1.5.2 Penentuan Dosis Madu

Madu yang digunakan dalam penelitian ini adalah madu hutan Sumbawa yang diperoleh dari hutan produksi di Sumbawa. Pada penelitian Al – Yahya *et al.*, (2013) telah dilakukan *Acute Toxicity Test* pada tikus untuk mengetahui LD₅₀ melalui peroral. Hasilnya yakni tidak ditemukan gejala toksisitas madu hingga dosis 5 g/kg BB. Dengan dasar ini maka dosis yang akan diujikan yaitu masing-masing 25mg/kg BB untuk kelompok C, 50 mg/kg BB untuk kelompok D dan 75 mg/kg BB untuk kelompok E.

Madu hutan Sumbawa diberikan pada hewan coba kelompok perlakuan 1, 2 dan 3. Dosis terapi preventif madu kelompok 1 sebesar 25 mg/kg BB, pada kelompok 2 sebesar 50 mg/kg BB, sedangkan kelompok 3 sebesar 75 mg/kg BB yang diberikan secara sonde lambung 1 kali sehari selama 14 hari. Volume larutan yang disondekan adalah tiap dosis madu yang telah diencerkan dengan aquades. Terapi preventif madu hutan Sumbawa pada kelompok perlakuan 1, 2 dan 2 dilakukan sehari sekali selama dua minggu berturut-turut menggunakan sonde pada **Lampiran 2**.

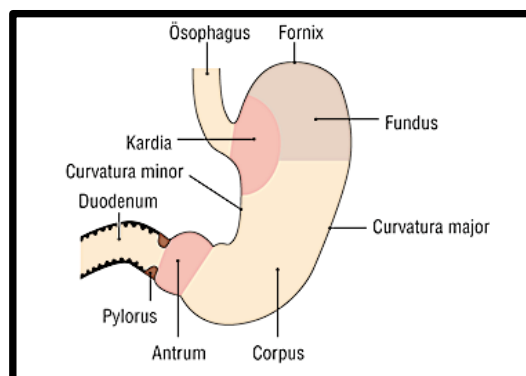
1.5.3 Pemberian Plumbum (Pb)

Plumbum (Pb) yang diberikan adalah Pb dalam bentukan serbuk berwarna putih yang dilarutkan dengan aquades 1 mL dan diberikan per oral dengan

menggunakan sonde lambung. Plumbum diberikan 10 mg/ekor/hari pada kelompok kontrol positif, kelompok perlakuan 3, perlakuan 4 dan perlakuan 5 selama 2 minggu (14 hari), karena menurut penelitian sebelumnya dengan pemberian Pb sebanyak 10 mg/hari selama 14 hari dapat menyebabkan peningkatan degenerasi dan nekrosis pada sel hepar (Suprijono dkk., 2011). Pemberian plumbum dan perhitungan dosis secara lengkap dapat dilihat pada **Lampiran 3**.

1.5.4 Pengambilan Organ Lambung Tikus

Pengambilan organ lambung tikus dilakukan setelah perlakuan selesai dilakukan. Pengambilan organ lambung dilakukan dengan cara euthanasi melalui dislokasi pada leher tikus, kemudian fiksasi ke empat kaki tikus. Pembedahan dilakukan pada rongga abdomen, dimana tikus diletakkan dengan posisi rebah dorsal di atas papan bedah. Selanjutnya dilakukan pembedahan abdomen dari arah caudal ke cranial hingga terbuka rongga thorax. Organ lambung diambil dan dilakukan insisi menggunakan gunting bedah (Wati dkk, 2013). Lambung dipotong simetris kiri dan kanan pada *curvatura major* dan semua cairan lambung dikeluarkan (Djama'an, 2008).



Gambar 4.1 Anatomi lambung bagian *curvature major*

Setelah itu lambung dibilas menggunakan NaCl fisiologis 0,9% dingin. Salah satu bagian organ lambung disimpan ke dalam PBS-azida pH 7,4 dan disimpan di lemari pendingin sedangkan bagian yang lain dimasukkan ke dalam larutan formaldehid 10% untuk pembuatan preparat histopatologi (Wati dkk, 2013).

Lampiran 4.

1.5.5 Isolasi Protease

Lambung yang telah diisolasi ditimbang seberat 0,3 gram dan dipotong kecil-kecil dengan menggunakan gunting bedah, setelah itu ditambahkan PBS-Tween : PMSF dengan perbandingan 9:1 sebanyak 1 mL. Tambahkan sedikit pasir kuarsa, gerus dengan mortar dingin yang diletakkan di atas balok es. Homogenat yang telah terbentuk ditambah lagi dengan PBS-Tween : PMSF dengan perbandingan 9:1 sebanyak 2 mL dan dipindahkan ke dalam *microtube* yang disterilisasi dengan *autoclaf*. Setelah itu homogenkan dengan alat getar vorteks selama 10 menit, disonikasi dengan sonikator selama 10 menit dan sentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 6000 rpm. Supernatan diambil dan ditambah etanol absolut dingin dengan perbandingan 1:1 dan dibiarkan selama 2 jam hingga membentuk endapan. Setelah itu sentrifugasi kembali selama 15 menit dengan kecepatan 10.000 rpm, endapan diambil dan dikeringkan sampai bau etanol hilang. Lalu tambahkan endapan tersebut dengan larutan 0,02 M Tris-HCl pH 6,5 dengan perbandingan 1:1 dan lakukan homogenisasi (Wati dkk., 2013).

1.5.6 Pengukuran Aktivitas Protease

Penentuan aktivitas protease dilakukan untuk mengukur tingkat inflamasi yang terjadi pada lambung. Menurut Widyastuti dkk. (2012), uji aktivitas protease

diukur pada kondisi optimum yaitu pH 7 dan suhu 37°C serta waktu inkubasi 60 menit.

Aktivitas protease ditentukan dengan uji Walter yang menggunakan kasein sebagai substrat agar bereaksi dengan enzim dan didiamkan pada suhu ruang. Reaksi dihentikan dengan menggunakan asam trikloro asetat (TCA) 4% kemudian diinkubasi selama 30 menit lalu sentrifugasi pada 4000 rpm selama 10 menit. Setelah itu, supernatan diambil lalu ditambahkan buffer fosfat 5 kali volume sampel dan absorbansi dibaca pada panjang gelombang maksimum tirosin (Artika, 2005). Metode ini didasarkan pada kemampuan enzim dalam menghidrolisis substrat kasein menjadi peptida-peptida dan asam amino (Kusumadjaja, 2005).

Lampiran 5.

Perhitungan enzim protease dilakukan dengan memasukkan nilai absorbansi protease yang telah diperoleh ke dalam persamaan kurva baku tirosin untuk mendapatkan nilai tirosin yang terbentuk pada reaksi enzimatik, setelah itu dihitung dengan rumus:

$$\text{Aktivitas enzim} = \frac{[\text{Tirosin}]}{\text{Mr Tirosin}} \times \frac{v}{p \times q} \times \text{fp}$$

Keterangan:

v : volume total sampel (ml)

p : jumlah enzim (ml)

q : waktu inkubasi (menit)

fp : faktor pengenceran

1.5.7 Histopatologi Lambung

1.5.7.1 Pembuatan Preparat dan Perwarnaan *Hematoxyline Eosin* (HE)

Histopatologi Lambung

Proses pembuatan preparat histologi terdiri dari fiksasi, dehidrasi, *clearing*, *embedding*, *sectioning*, deparafinasi, rehidrasi, perwarnaan, dehidrasi, *clearing* dan *mounting* (Junquiera and Carneiro, 2005). Tahapan pembuatan preparat dimulai dengan melakukan fiksasi yaitu merendam organ lambung dalam formaldehid 10% selama 24 jam. Fiksasi dilakukan untuk mencegah kerusakan pada jaringan, menghentikan proses metabolisme, mengawetkan komponen sitologi dan histologi, dan mengeraskan materi yang lunak agar jaringan dapat diwarnai.

Tahap selanjutnya adalah dehidrasi, dilakukan untuk mengeluarkan air dari jaringan agar jaringan tersebut dapat diisi oleh parafin sehingga jaringan dapat diiris tipis. Proses dehidrasi menggunakan alkohol bertingkat mulai dari 70%, 80%, 90% dan 95% masing-masing selama 5 menit. Selanjutnya adalah tahap penjernihan organ (*clearing*) dilakukan dengan mulai pemindahan jaringan ke larutan penjernihan yaitu *xylol* I (1 jam), *xylol* II dan *xylol* III (30 menit pada suhu kamar dan 30 menit pada inkubator).

Selanjutnya adalah *embedding*, dimana organ dimasukkan ke dalam parafin cair dengan suhu 56°C selama 2 jam dan kemudian diambil dengan pinset dan dilanjutkan pemblokkan dengan parafin blok yang berukuran sesuai dengan tempat blok *microtome*. *Embedding* berfungsi agar organ lebih padat. Blok tersebut dipasang pada *microtome* dan diatur agar posisinya sejajar dengan posisi

pisau. Blok parafin dipotong (*sectioning*) dengan ketebalan 3 μm dan direndam pada *water bath* dengan suhu 38–40 °C. Awal pemotongan dilakukan *trimming* karena jaringan yang dipotong masih belum sempurna. Kemudian irisan yang didapat diletakkan pada *object glass*. Sediaan disimpan pada inkubator dengan suhu 37-38 °C selama semalam lalu siap diwarnai dengan pewarnaan HE (Wati dkk., 2013).

Tahapan pewarnaan *Hematoxyline Eosin* (HE) dimulai dengan tahapan deparafinasi yaitu dengan memasukkan preparat ke dalam xylol bertingkat I–III masing-masing selama 5 menit. Tujuan adalah untuk menghilangkan/melarutkan parafin yang terdapat pada jaringan. Selanjutnya, dilakukan tahapan rehidrasi, dimana preparat dimasukkan dalam alkohol, mulai dari alkohol 95%, 90%, 80% dan 70% masing-masing selama 5 menit, lalu direndam dalam aquades selama 5 menit. Setelah itu, dilakukan perwarnaan preparat yang dimasukkan dalam pewarna *hematoxyline* selama 10 menit. Tujuannya adalah untuk memberi warna pada inti sel atau nukleus. Kemudian dicuci dengan aquades selama 5 menit, dibilas dengan aquades dan dimasukkan ke dalam pewarna *eosin* selama 5 menit. Tujuannya adalah untuk memberi warna merah pada sitoplasma sel. Selanjutnya, preparat direndam dalam aquades untuk menghilangkan pewarna *eosin* yang masih menempel.

Tahap selanjutnya adalah dilakukan dehidrasi dengan memasukkan preparat ke dalam alkohol bertingkat dari 70%, 80%, 90% dan 95% yang bertujuan untuk menghilangkan air dari jaringan. Selanjutnya, dilakukan *clearing* dengan memasukkan preparat pada xylol I–III dan dikeringkan. Selanjutnya, dilakukan

mounting dengan menggunakan entellan (Jusuf, 2009). Pembuatan preparat dan pewarnaan *Hematoxyline Eosin* (HE) secara lengkap dijelaskan pada **Lampiran 5**.

1.5.7.2 Pengamatan Histopatologi

Pengamatan histologi lambung dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya *Olympus BX51* dengan perbesaran 100x, 200x dan 400x. Pengamatan histopatologi lambung yang diamati adalah bagian corpus dan fundus lambung pada lapisan tunika mukosa kemudian dianalisa secara deskriptif.

4.6 Analisa Data

Data penelitian aktivitas protease yang diperoleh dari hasil pengukuran aktivitas enzim protease secara kuantitatif menggunakan metode spektrofotometri dengan spektrofotometer menggunakan panjang gelombang maksimal 530 yang berfungsi untuk mengetahui aktivitas protease dengan pengamatan gambaran histopatologi lambung. Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini adalah kuantitatif statistik untuk aktivitas enzim protease dan analisa kualitatif deskriptif untuk gambaran histopatologi lambung. Analisa kuantitatif dengan menggunakan Analisis Ragam *one way ANOVA* menggunakan *software SPSS (Statistical Package for Social Sciences)* 22,0. Perlakuan uji lanjutan $\text{BNJ } \alpha = 5\%$ untuk melihat dan menganalisa perbedaan antar kelompok perlakuan, sedangkan gambaran histopatologi dianalisis deskriptif dengan membandingkan kerusakan jaringan antar kelompok.



BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Pengaruh Terapi Preventif Madu Hutan Sumbawa Terhadap Aktivitas Protease dan Histopatologi Lambung Tikus (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi Plumbum (Pb)

Enzim protease secara normal di dalam tubuh berfungsi untuk menghidrolisis ikatan peptida dalam rantai protein. Enzim proteolitik yang dihasilkan oleh lambung dalam keadaan normal berfungsi untuk memecah protein makanan menjadi asam amino dan mencerna sel-sel epitel yang secara teratur lepas ke dalam lumen untuk diganti dengan sel yang baru (regresi lumen). Enzim protease yang ada pada saluran pencernaan adalah pepsin, tripsin, kimotripsin, dan elastase. Dalam sistem pencernaan hewan, protein dari pakan tidak langsung diserap tetapi didegradasi terlebih dahulu oleh enzim protease menjadi asam amino atau peptida kemudian diserap tubuh. Proses degradasi protein ini terjadi di lambung dan intestin, sementara penyerapan makanan terjadi di duodenum dan jejunum (Fujaya, 2004). Selain untuk degradasi protein nutrisi, protease juga diperlukan dalam sejumlah reaksi biokimia tubuh seperti mekanisme patogenisitas, proses koagulasi darah, proses sporulasi, diferensiasi, sejumlah proses pasca translasi protein, dan mekanisme ekspresi protein ekstra seluler (Rao et al., 1998).

Pengukuran aktivitas protease dibagi berdasarkan 5 kelompok perlakuan yaitu kelompok kontrol negatif yang tanpa diberikan perlakuan, kontrol positif yang diinduksi plumbum dengan cara diencerkan dengan aquades 1 mL dan diberikan per oral dengan menggunakan sonde lambung. Plumbum diberikan 10 mg/ekor/hari pada kelompok kontrol positif, perlakuan 1, perlakuan 2 dan perlakuan 3 selama 2

minggu (14 hari) dan terapi preventif madu perlakuan 1 dosis 25 mg/kg BB, pada perlakuan 2 dosis 50 mg/kg BB, sedangkan perlakuan 3 dosis 75 mg/kg BB yang diberikan secara sonde lambung 1 kali sehari selama 14 hari. Hasil dari pengukuran aktivitas protease lambung tikus (*Rattus norvegicus*) dalam 5 perlakuan tersebut terdapat pada **tabel 5.1**.

Tabel 5.1 Rata-Rata Aktivitas Protease Lambung Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) pada Masing-Masing Perlakuan Penelitian

Kelompok Perlakuan Penelitian	Rata-Rata Aktivitas Protease Lambung ($\mu\text{mol/mL.menit}$)	Rata-Rata Aktivitas Protease Lambung (%)	Penurunan Aktivitas Protease terhadap K+ (%)
Kontrol Sehat (K-)	$3,87 \times 10^{-2} \pm 0,000854^a$	60%	40%
Kontrol Sakit (K+)	$6,4 \times 10^{-2} \pm 0,00216^c$	100%	-
Perlakuan I (P1) (25 mg/kg BB/hari)	$6,0 \times 10^{-2} \pm 0,00258^{bc}$	93%	7%
Perlakuan II (P2) (50 mg/kg BB/hari)	$5,42 \times 10^{-2} \pm 0,00330^b$	84%	16%
Perlakuan III (P3) (75 mg/kg BB/hari)	$4,42 \times 10^{-2} \pm 0,0099^a$	69%	31%

Keterangan :

- Notasi (a, b, c) menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($p < 0,01$) antara perlakuan

Prinsip pengukuran aktivitas protease adalah mengukur asam amino tirosin yang terhidrolisis dari substrat. Enzim protease menghidrolisis substrat kasein dengan bantuan air, menjadi asam amino dan peptida. Reaksi dihentikan dengan

menambahkan TCA (asam trikloro asetat). Serapan asam amino tirosin diukur dan digunakan sebagai standar untuk mengetahui adanya peningkatan yang terjadi akibat pengaruh perlakuan. Protease secara normal terdapat di dalam jaringan tubuh yang berperan dalam pertahanan seluler yaitu pemecahan protein asing yang masuk ke dalam tubuh.

Aktivitas protease kelompok kontrol negatif yang didapatkan adalah $3,875 \times 10^{-2} \pm 0,000854$ $\mu\text{mol/mL}$ dengan peningkatan aktivitas protease. Kontrol negatif tanpa diberikan terapi preventif madu hutan Sumbawa hanya diberikan minum dan pakan dengan berat 15-20 gr/hari. Nilai aktivitas protease pada kontrol negatif digunakan sebagai standar untuk menentukan adanya peningkatan yang terjadi karena adanya pengaruh perlakuan. Kadar protein normal dalam tubuh adalah 16% (Bintari, 2014). Unit aktivitas protease dari lambung tikus (*Rattus norvegicus*) didefinisikan sebagai banyaknya mikro mol (μmol) tirosin yang dihasilkan dari hidrolisis ikatan peptida pada protein oleh protease isolasi dari lambung *Rattus norvegicus*.

Kelompok kontrol positif terdapat perbedaan yang nyata ($p < 0,01$) dengan kelompok kontrol negatif. Aktivitas enzim protease pada kelompok kontrol positif yang didapatkan adalah $6,4 \times 10^{-2} \pm 0,00216$ $\mu\text{mol/mL}$. Peningkatan aktivitas protease menyebabkan terjadinya inflamasi pada lambung tikus yang akan mengaktivasi sel-sel *proinflammatory* serta pelepasan enzim protease. Keadaan tersebut sesuai dengan pernyataan (Stephenson 1992; Wallace *et al.*, 1995; Dunlop & Malbert 2004) yang menyatakan bahwa dalam keadaan inflamasi akan menyebabkan terjadinya infiltrasi sel-sel inflamasi seperti neutrofil yang dapat melepaskan enzim protease.

Induksi plumbum pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) dapat meningkatkan kadar radikal bebas eksogen, yaitu ROS dalam tubuh. *Radical Oxygen Species* (ROS) berasal dari plumbum yang telah diencerkan dengan aquades. Pada keadaan normal, terjadi keseimbangan antara pembentukan antioksidan dan radikal bebas di dalam tubuh. Induksi plumbum memicu stres oksidatif dimana terjadi ketidakseimbangan antara antioksidan dan radikal bebas dalam tubuh, sehingga memicu aktivitas makrofag untuk mensekresi sitokin yang selanjutnya akan mengaktifasi neutrofil. Neutrofil akan menghasilkan enzim protease dalam jumlah besar akibat radikal bebas yang tinggi di dalam tubuh dan stres oksidatif akan memicu kerusakan jaringan.

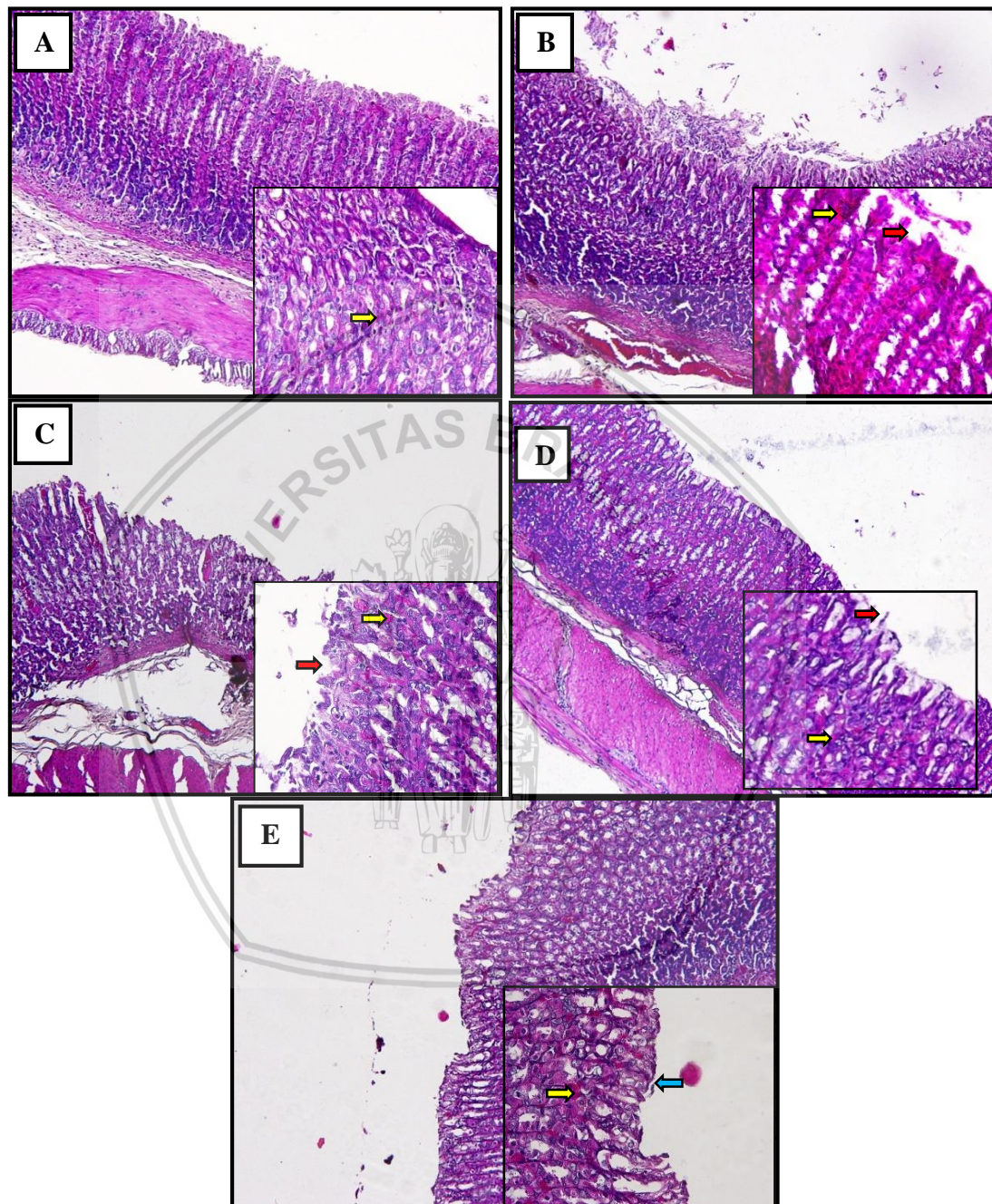
Hasil uji kelompok perlakuan 1 (dosis 25 mg/kg BB) dan Kelompok perlakuan 2 (dosis 50 mg/kg BB) tidak berbeda nyata dapat dilihat dari nilai aktivitas protease sebesar $6,0 \times 10^{-2} \pm 0,00258$ $\mu\text{mol/mL}$ dan $5,42 \times 10^{-2} \pm 0,00330$ $\mu\text{mol/mL}$ dan penurunan aktivitas protease sebesar 7% dan 16% yang menunjukkan bahwa perlakuan 1 dan 2 terjadi penurunan aktivitas protease pada lambung dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Hal ini terjadi akibat kandungan antioksidan di dalam madu hutan Sumbawa yang mampu menghambat radikal bebas didalam tubuh, sehingga menurunkan aktivitas protease. Pemberian dosis ini masih jauh dari kontrol negatif yang ditunjukkan dengan perbedaan notasi. Persamaan notasi pada perlakuan 1 dan 2 menunjukkan hasil yang kurang signifikan namun masih menunjukkan perbedaan notasi dengan kelompok kontrol negatif, yang berarti dosis ini masih kurang efektif dari yang diterapkan.

Kelompok perlakuan 3 (dosis 75 mg/kg BB) tidak berbeda nyata terhadap kontrol negatif. Hasil yang didapatkan pada perlakuan 3 tidak berbeda nyata yang menunjukkan bahwa dosis yang diberikan pada tikus kelompok perlakuan 3 merupakan dosis terbaik diantara dosis 1 dan 2. Aktivitas protease menunjukkan hasil yang signifikan yaitu sebesar $4,42 \times 10^{-2} \pm 0,0099$ $\mu\text{mol/mL}$ dan penurunan aktivitas protease sebesar 31% dibandingkan dengan kontrol positif. Dosis kelompok perlakuan 3 ini mampu memberikan efek yang diharapkan. Hal ini menunjukkan bahwa semakin besar dosis madu hutan Sumbawa yang diberikan, maka semakin besar pula penurunan aktivitas protease lambung. Madu hutan Sumbawa mengandung senyawa bioaktif yaitu flavonoid berdasarkan uji kualitatif (**Lampiran 8**) dapat bekerja sebagai antioksidan untuk menekan kenaikan aktivitas protease dalam tubuh. Hal tersebut ditunjukkan dengan hambatan peningkatan aktivitas protease yang ditunjukkan pada kelompok preventif madu perlakuan 1,2 dan 3. Pemberian madu hutan Sumbawa ini juga mampu menghambat dan mencegah terjadinya oksidasi seluler dan inflamasi, dua faktor utama yang dapat menyebabkan kerusakan lambung, sehingga dapat menghambat kenaikan aktivitas protease. Hal tersebut membuktikan bahwa madu hutan Sumbawa mampu mengikat radikal bebas di dalam tubuh yang disebabkan induksi plumbum sehingga mampu menekan terjadinya stres oksidatif yang akan menyebabkan peroksidase lipid di dalam membran sel. Tidak terjadi stres oksidatif maka akan menekan pembentukan NF- κ B yang merupakan pembentuk TNF- α (Chattopadhyay *et al.*, 2006). Tidak teraktivasi TNF- α maka aktivasi neutrofil yang berfungsi sebagai

imunitas pertama akan menurun. Penurunan neutrofil akan menekan pelepasan protease, sehingga aktivitas protease pada lambung tidak meningkat.

Pemberian madu hutan Sumbawa dapat menghambat peningkatan aktivitas protease. Kelompok preventif dengan dosis 25 mg/kg BB, 50 mg/kg BB dan 75 mg/kg BB memiliki nilai aktivitas protease sebesar $6,0 \times 10^{-2} \pm 0,00258$ $\mu\text{mol/mL}$, $5,42 \times 10^{-2} \pm 0,00330$ $\mu\text{mol/mL}$ dan $4,42 \times 10^{-2} \pm 0,0099$ $\mu\text{mol/mL}$ dan penurunan aktivitas protease sebesar 7%, 16% dan 31% berpengaruh terhadap aktivitas protease dan perubahan histopatologi lambung dan perbedaan yang signifikan namun diantaranya juga menunjukkan hasil yang berpengaruh terhadap aktivitas protease dan perubahan histopatologi lambung namun tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan terhadap kelompok kontrol positif. Kelompok preventif terbaik dengan demikian ditunjukkan pada kelompok dengan pemberian dosis 75 mg/kg BB yang menunjukkan perbedaan signifikan ($p < 0,01$) terhadap kelompok negatif, berdasarkan rata-rata dan hambatan peningkatan aktivitas protease tersebut dapat diketahui bahwa pemberian madu hutan Sumbawa mampu menekan kenaikan aktivitas protease.

5.2 Gambaran Histopatologi Lambung terhadap Pengaruh Terapi Preventif Madu Hutan Sumbawa yang Diinduksi Plumbum (Pb)



Gambar 5.1 Histopatologi mukosa lambung tikus putih dengan pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE), perbesaran 100x dan 400x

Keterangan:

(A) Tikus kontrol negatif; (B) tikus kontrol positif; (C) tikus dosis 25 mg/kg BB; (D) tikus dosis 50 mg/kg BB; (E) tikus dosis 75 mg/kg BB.

→ : Erosi lambung → : Hemoraghi → : Regenerasi sel epitel

Gambaran histopatologi pada perbesaran 100x dan 400x kontrol negatif yang tampak yaitu tersusun atas mukosa, muskularis eksterna dan submukosa. Batasan antar sel terlihat dengan jelas tampak sel epitel yang berjejer rapi yaitu columnar simpleks dan tampak *gastric pits* dibandingkan dengan kontrol positif, namun pada kontrol negatif ditemukan hemoraghi. Menurut Wilson (1994) Pada histopatologi lambung yang diamati tikus disusun oleh dua kompartemen yaitu lambung kelenjar yang tersusun oleh epitel silindris sebaris dan lambung tidak berkelenjar yang tersusun oleh epitel kubus berlapis. Mukosa lambung tersusun dari lipatan-lipatan longitudinal (*rugae*) yang terdiri atas lapis muskularis, lamina propria yang mengandung kelenjar serta *gastric pit*. Pada permukaan luminal lambung dilapisi oleh sel-sel epitel silindris sebaris. Sel-sel epitel silindris melakukan invaginasi ke dalam lamina propria membentuk *gastric pit*. Pada bagian dasar dari *gastric pit* terdapat isthmus, yang berlanjut ke dalam pintu masuk satu atau lebih kelenjar lambung (Cunningham 1992). Daerah submukosa lambung terdiri atas serat kolagen, jaringan lemak putih, pembuluh darah, dan plexus nervus submukosa (Dellmann & Eurell 1998).

Berbeda dengan gambaran histopatologis kelompok kontrol positif yang menunjukkan kerusakan sel, pada bagian dinding sel ditemukan banyak berupa hemorhagi dan erosi sel epitel dan kondisi sel epitel yang sudah tampak deskuamasi dibandingkan dengan kontrol negatif . Menurut Mustafa,, *et al* (2012) turunnya mekanisme pertahanan yang ada di lambung tersebut dan terjadi secara terus menerus akan mengakibatkan integritas sel-sel epitel sebagai lapisan pertahanan pada dinding lambung menurun. Hal ini akan mengakibatkan asam lambung mudah

menembus dan merusak lapisan mukosa lambung yang sensitif sehingga menyebabkan terjadinya abnormalitas pada sel mukosa lambung. Bahkan pada tingkatan yang lebih parah, kerusakan dapat menembus ke lapisan yang berada dibawah mukosa seperti muskularis mukosa dan sub mukosa.

Pada kelompok perlakuan 1 dengan dosis 25 mg/kg BB gambaran yang tampak yaitu masih terdapat hemoraghi pada mukosa lambung dan erosi sel epitel juga masih ditemukan, perubahan yang tampak tidak terlalu signifikan dibandingkan dengan kontrol negatif. Pada kelompok perlakuan 2 dengan dosis 50 mg/kg BB tampak hemoraghi mulai berkurang pada mukosa lambung dan erosi sel epitel juga berkurang akan tetapi masih terdapat erosi sel epitel dibandingkan dengan kontrol negatif. Sedangkan pada tikus kelompok perlakuan 3 masih ditemukan hemoraghi dan sel-sel epitel yang mengalami erosi mengalami perbaikan yang ditandai dengan adanya regenerasi sel-sel epitel (reepitelisasi) dikarenakan pengaruh kandungan flavonoid dari madu hutan Sumbawa dengan dosis 75 mg/kg BB merupakan dosis yang terbaik.

Senyawa plumbum yang masuk ke lambung akan menyebabkan akumulasi senyawa plumbum pada lambung. Senyawa plumbum yang terakumulasi di lambung akan mempengaruhi peningkatan faktor offensif yang ada di lambung yaitu salah satunya ROS yang akan mengakibatkan terjadinya peroksidase lipid. Kondisi ROS yang meningkat cenderung membentuk molekul yang stabil dengan mengambil elektron dari asam nukleat/lipid. Elektron dari lipid yang digunakan untuk membentuk molekul yang stabil yaitu atom hidrogen yang ada pada membran sel, sehingga lapisan mukosa dinding lambung yang sensitif akan mudah rusak dan

disebut dengan peroksidase lipid. Hal ini juga disertai dengan turunya faktor defensif yang ada di lambung seperti musin, prostaglandin, mukus bikarbonat, dan nitrit oksida. Menurunnya faktor-faktor defensif yang merupakan mekanisme pertahanan utama pada lambung akan menyebabkan dinding lambung kehilangan sistem pertahanan untuk melindungi diri dari serangan faktor-faktor offensif yang terus meningkat (Rofiqoh 2013).

Gambaran histopatologi berupa hemoraghi dan erosi sel epitel pada hewan kelompok perlakuan yang diinduksi plumbum dapat terjadi karena akumulasi senyawa plumbum pada lambung dapat menyerang mekanisme pertahanan yang ada di lambung. Menurut McGavin (2007), hemoraghi adalah kondisi keluarnya darah dari pembuluh darah akibat kerusakan dinding endotel. Hemoraghi dapat terjadi melalui robekan (reksis) atau melalui renggangan akibat berubahnya permeabilitas endotel. Plumbum dapat mengakibatkan terjadinya hemoraghi karena plumbum secara tidak langsung dapat memicu perubahan permeabilitas endotel terjadi reaksi inflamasi.

Mekanisme regenerasi sel diawali dengan adanya hemostasis dimana pada proses ini melibatkan platelet dan fibrin yang bertujuan untuk menghentikan terjadinya perdarahan. Selanjutnya terjadi proses inflamasi, yang melibatkan aktivasi makrofag dan neutrofil menuju jaringan untuk fagositosis sel - sel debris, sel nekrosis dan sel bakteri. Selanjutnya neutrofil akan mengalami apoptosis dan menstimulasi makrofag untuk mengeluarkan mediator seperti *growth factor* (*vascular endothelial growth factor*) dan fibronectin. Mediator yang dikeluarkan oleh makrofag tersebut akan mengaktifkan stem sel untuk berproliferasi. Pada saat

terjadi proliferasi stem sel akan berdeferensiasi membentuk pembuluh darah baru (angiogenesis/*neovascularisasi*) dan epitelisasi, selain itu proses proliferasi juga akan memicu terjadinya pemebentukan granulasi, penurunan kolagen dan kontraksi pada luka. Pada proses ini sel-sel yang tidak diperlukan akan mengalami apoptosis. Proses selanjutnya yang terjadi yaitu maturasi dan remodelling dimana pada proses ini akan terbentuk jaringan ikat (Martin dan leibovich, 2005).

Pada penelitian ini, pemberian preventif madu hutan Sumbawa mempunyai senyawa antioksidan seperti flavonoid sebagai antioksidan eksogen yang dapat menghambat kerusakan lambung. Hal tersebut didasarkan pada terjadinya penghambatan sel lambung yang mengalami erosi sel epitel serta penghambatan peningkatan aktivitas protease. Hasil analisis gambaran hisopatologi lambung dan hasil aktivitas protease menunjukkan hasil yang saling mendukung dan membuktikan bahwa pemberian madu sebagai preventif dapat digunakan untuk mencegah radikal bebas yang disebabkan oleh induksi plumbum di lambung.

Semua dosis madu hutan Sumbawa berpotensi menghambat kerusakan sel lambung baik pada dosis 50 mg/kg BB dan 75 mg/kg BB. Namun dosis efektif madu hutan Sumbawa yang dapat menghambat kerusakan lambung adalah 75 mg/kg BB, karena dapat menghambat peningkatan aktivitas protease sehingga menunjukkan penurunan nilai aktivitas protease sebesar $4,44 \times 10^{-2} \pm 0,0099$ $\mu\text{mol/mL}$ dengan penurunan aktivitas protease sebesar 31% dan pada histopatologi menunjukkan gambaran lambung yang mengalami reepitelisasi yang dimulai dengan tidak adanya deskuamasi diikuti dengan mulai tumbuhnya epitel pada bagian mukosa lambung.



BAB 6 PENUTUP

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa:

1. Pemberian terapi madu hutan Sumbawa berpengaruh terhadap penurunan aktivitas protease secara signifikan pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi plumbum.
2. Pemberian terapi madu hutan Sumbawa berpengaruh terhadap gambaran histopatologi lambung ditandai dengan mulai terbentuknya epitel pada mukosa lambung atau reepitelisasi menggunakan dosis 75 mg/kg BB pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi dengan plumbum.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A. K., A. H. Litchman., and S. Pilai. 2015. *Cellular and Molecular Immunology. 8th edition*. Philadelphia: Elsevier
- Ahmad Y.A. 2008. *Al-Qur'an Kitab Kedokteran*. Yogyakarta: Sajadah Press. Hal:328.
- Al-Yahya, Mohammed, Ramzi, Mothana., Mansour, Al-Said. 2013. Attenuation of CCl₄-Induced Oxidative Stress and Hepatonephrotoxicity by Saudi Sidr Honey in Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2013, Article ID 569037. Doi:10.1155/2013/569037.
- Angkat, A. 2008. *The Removal of Plumbum and Zinc Using Activated Carbon*. University Malaysia Pahang.
- AOAC, International. 2005. *Official Method of Analysis of AOAC International*. Vol.2. Association of Analytical Community. USA.
- Arief, S, Radikal Bebas, Bagian Ilmu Kesehatan Anak FK Unair/ RS. Dr. Sutomo, Surabaya, 2006
- Artika, Wiwit. 2005. Produksi dan pengukuran aktivitas protease dari isolat bakteri BKL-1 dan BKU-31. Program Studi Pendidikan Biologi. Unsyiah Darussalam. Banda Aceh.
- Boer, Y., 2000, Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kulit Buah Kandis (*Garcinia parvifolia* Miq), *Jurnal Matematika dan IPA 1*, (1) hal 26- 33
- Chattopadhyay I, Bandyopadhyay U, Biswas K *et al.*,. 2006. *Indomethacin inactivates gastric peroxidase to induce reactive-oxygen-mediated gastric mucosal injury and curcumin protects it by preventing peroxidase inactivation and scavenging reactive oxygen*. Free Radical Biology Med. 40: 1397-1408.
- Cunningham. 1992. *Textbook of Veterinary Physiology*. United States of America: W. B. Saunders Company.
- Darmono. 1995. *Logam dalam sistem biologi makhluk hidup*. Jakarta: UI press. 139 Hlm.

- Dellman HD & Eurell JA. 1998. *Textbook of Veterinary Histology*. Ed ke-5. New York: Lippincott Williams & Wilkins.
- DepKes. 2001. Kerangka Acuan Uji Petik Kadar Timbal (Pb) pada Spesimen Darah Kelompok Masyarakat Berisiko Tinggi Pencemaran Timbal. Ditjen PPM dan PLP Departemen Kesehatan RI Jakarta.
- Diponegoro, Wardan, M. 1997. Padi Bengawan Solo Mengandung Logam Berat. Kompas. 1 Desember 1998. Jakarta.
- Djama'an, Q. 2008. Pengaruh Air Perasan Daun *Cyclea barbata* Miers (Cincau Hijau) terhadap Konsentrasi HCl Lambung dan Gambaran Histopatologik Lambung Tikus Galur Wistar yang Diinduksi *Acetylsalicylic acid*. Universitas Diponegoro
- Dunlop RH & C.H. Malbert. 2004. Pathophysiology of The Gastrointestinal Tract. Veterinary Pathophysiology. Iowa: Blackwell Publishing. Pp: 111 - 142
- Ernawati, E. F. 2010. Efek Antiseptik Ekstrak Daun Pare (*Momordica charantia* L.) pada Tikus Putih Jantan [Skripsi]. Fakultas Kedokteran. Universitas Sebelas Maret
- Fardiaz, 2001. Polusi Air dan Udara. Diterbitkan dalam rangka Kerja Sama dengan Pusat.
- Gurer H, Ercal N. 2000. Can Antioxidants be Beneficial in The Treatment of Lead Poisoning. *Free Radic Biol Med*; 29(10):927-945
- Guyton A. C., and J. E. Hail. 2007. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. Edisi 9. Jakarta: EGC
- Handoko, C. 2006. Teknologi Peningkatan Kualitas Madu di NTB. Laporan Penelitian (Publikasi Terbatas). Balai Penelitian dan Pengembangan Kehutanan Bali dan Nusa Tenggara. Kupang.
- Hariono, B., 2005, Efek Pemberian Plumbum (Timah Hitam) Anorganik pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*), J. Sain Vet Vol 23 No. 2 Th. 2005, Bagian Patologi Klinik FKH UGM, Yogyakarta, 107-108.
- Hidayat, A., W. Christijanti., A. Marianti. 2013. Pengaruh Vitamin E terhadap Kadar SGPT dan SGOT Tikus Putih Galur Wistar yang Dipapar Timbal. *Unnes Journal of Life Science*. 2(1): 16-21

- Hutagalung LE. 2008. Perkembangan Perolehan Madu Lebah Hutan (*Apis dorsata*) oleh Pemanen Madu di Kabupaten Tapanuli Utara. [Skripsi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Ibrahim, D., Froberg, B., Wolf, A. *et al.*, 2006. Heavy Metal Poisoning: Clinical Presentations and Pathophysiology. *Clin Lab Med.* 26:67-97.
- Ilmiana A.R. 2008. Daya Antibakteri Madu Terhadap Infeksi Bakteri dari Inokulasi pasien Abses Secara Invitro. *Jurnal Universitas Negeri Jember* 2(4): 3-8
- Irina, P., P. Carasela., C. Cristina., A. Lazar., C. Banu., and V. Giancarla. 2011. *Studies Concerning The Lead Effect In Vitro and In Vivo on The Plants Development of Lycopersium esculentum L.* *Journal of Horticulture Forestry, and Biotechnology.* 15(4) : 147-150
- Jaishankar M, Tseten T, Anbalagan N, Mathew BB, Beeregowda KN. 2014. Toxicity, Mechanism and Health Effects of Some Heavy Metals. *Interdiscip Toxicol.* 7(2): 60–72.
- Jamilyadhatus, S. 2013. *Aktivitas Antibakteri dan Antioksidan Tiga Jenis Madu Hutan Indonesia* [Skripsi]. Fakultas Kehutanan Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Jull, AB., Rodgers, A., Walker, N. 08-10-2009. Honey as a Topical treatment for wounds. NCBI.
- Junqueira, L.C., Carneiro, J., Kelley, R.O., alih bahasa, Jan Tambayong. ,2007, *Histologi Dasar*, Edisi ke-8, Jakarta. EGC. hlm: 370-387.
- Jusuf, A. A. 2009. *Histoteknik Dasar*. Bagian Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Depok.
- Kelly, G. S. 2011. Quercetin. Alternative Medicine Review. *The Official Journal of The American College for Advancement in Medicine.* 16(2): 172-194
- Kucuk M, Kolayli S, Karaoglu S, Ulusoy E, Baltac C, F Candan F. Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. *Food Chemistry.* 2007;100:526–534
- Kusumawati, D. 2004. Bersahabat dengan Hewan Coba. Gajah Mada University Press: Yogyakarta

- Kusriningrum R. 2008. *Dasar Perancangan Percobaan Rancangan Acak Lengkap*. Universitas Airlangga. Surabaya
- Koolhas, J.M. 2010. *The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals. Eight Edition*. S.n., pp. 311-326
- Korkmaz, B., M.S. Horwitz., D.E. Jenne., F. Gauthier. 2010. Neutrophil Elastase, Proteinase 3, and Cathepsin G as Therapeutic Targets in Human Disease. *Pharmacological Reviews*. 62(4): 726-759
- Kowalski S., Łukasiewicz M., Berski W., 2013. Applicability of physico-chemical parameters of honey for identification of the botanical origin. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment*. 12(1), 51-59.
- Lelo, A. 2008. *Efek Farmakologi Madu*. Peduli Kesehatan Message 2(10): 14-20.
- Lu CF, Toksikologi Dasar, Ed 2, UI Press, 1995:206-220 Santosa MH. Uji Toksisitas Akut Dan Subakut Ekstrak Etanol Dan Ekstrak Air Kulit Batang Artocarpus Champeden Spreng Dengan Parameter Histopatologi Hati Mencit. *Majalah Farmasi Airlangga* 2005 ,91-5.
- Lubis B, Rosdiana N, Nafianti S, Rasyianti O, Panjaitan FM. 2013. Hubungan Keracunan Timbal dengan Anemia Defisiensi Besi pada Anak. *CDK-200*. 40(1):17–21.
- Marks, D.B., A.D. Marks., C.M. Smith. 2000. *Biokimia Kedokteran Dasar: sebuah pendekatan Klinis*. Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Martin, P., Leibovich, K. and Longaker, M.T., 2005. Inflammatory Cells During Wound Repair. *Pubmed National Library of Medicine: United States*
- McGavin, M.D., dan Zachary, J.F. (2007). *Pathologic Basic of Veterinary Disease*. kota: Mosby, Inc. Halaman12-17.
- Mukono, 2002. *Prinsip Dasar Kesehatan Lingkungan*. Air Langga University Press. Surabaya.
- Mustafa RA, Hamis AA, Mohamed S and Bakar FA. 2010. Total phenolic compounds, flavonoids, and radical scavenging activity of 21 Selected Tropical Plants. *J Food Sci* 75: 28-30.

- Naria, 1999. Pengaruh Penyiraman Air Sungai Cipinang dan Air Tanah Terhadap Kandungan Timbal pada Beberapa Jenis Tanaman Sayuran. Thesis. Universitas Indonesia. Jakarta.
- Ostrovskaya SS, Shatornaya VF, Kolosova I. 2011. Combined impact of plumbum and cadmium on the organism. *Foreigning Literature Review*. 2011–13.
- Park JY, Lumbea WML, Dela Cruz JF, Jeong SE, Hwang SG. 2015. The Hot Water Extract of *Angelica gigas nakai* Root Promotes Adipogenic Differentiation via Activation of the Insulin Signaling Pathway in 3T3-L1 Cells. *J Phys Pharm*, 5(11): 795-802
- Parwata, I. M., K. Ratnayani., A. Listia. 2010. Aktivitas Antiradikal Bebas serta Kadar Beta Karoten pada Madu Kapuk (*Cieba pentandara*) dan Madu Kelelengkeng (*NepHelium longata L.*). *Jurnal Kimia*, 4(1): 54-62
- Rahmah, N.L., 2012. The Potency of Sargassum duplicatum Bory Extract on Inflammatory Boel Disease Therapy in *Rattus norvegicus*. *Journal of Life Science* 6, pp. 144-155.
- Rao, M.B., A.M. Tanksale, M.S Ghatge, and V.V DespHande. 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbial And Molecular Biology Rev. Sci Am*, 62(3): 597-635
- Rizkiani, I. 2009. *Pengaruh Pemberian Kopi Dosis Bertingkat Peroral Selama 30 Hari Terhadap Gambaran Histologi Lambung Tikus Wistar*. Universitas Diponegoro Semarang.
- Rofiqoh N & Taufikurohmah T. 2013. Pengaruh infiltrasi nanogold terhadap peningkatan kualitas jaringan dan kuantitas merkuri pada lambung mencit (*Mus musculus*) setelah terpapar merkuri. *Journal of Chemistry* 2(3): 24-33.
- Rosanna, D. P., dan C. Salvatore. 2012. Reactive Oxygen Species, Inflammation, and Lung Disease. *Current PHarmaceutical Design*. 18(26): 3889-3900
- Saktiyono. 2004. *IPA BIOLOGI SMP dan MTS Jilid 2*. Esis. Erlangga: Jakarta
- Sawhney, S.K and Singh. 2008. *Introductory Ptractical Biochemistry 2nd ed*. P.111-112 Narosa Publishing House Pvt.Ltd: New Delhi
- Sirois, M. 2005. *Laboratory Animal Medicine: Principles and Procedures*. Elsevier-Saunders.p. United States of America

- Sivasubramaniam, L. 2005. Liquid Gold Honey. *Medicinal Properties Review* 3(2): 3-7
- Sudarwin. 2008. *Analisi Spasial Pencemaran Logam Berat (Pb dan Cd) Pada Sedimen Aliran Sungai dari Tempat Pembuangan Akhir (TPA) Sampah Jatibarang Semarang*. Universitas Diponegoro Semarang.
- Suprijono, A. Chodidjah, dan S. Banun. 2011. *Pengaruh Pemberian Timbal (Pb) Per Oral Terhadap Gambaran Histopatologi Hepar*. Jurnal Majalah Ilmiah Sultan Agung. Volume 49 Nomor 123. Semarang.
- Srisook, K., d. Buapool., R. Boonbai., P. Simmasut., Y. Char oensuk., and E. Srisook 2012. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Hot Water Extract from *Pluchea indica Less.* Herbal Tea. *Journal of Medicinal Plants Research*. 6(23): 44407-4081
- Stephenson TJ. 1992. Inflammation. *General and systemic Pathology*. Underwood JCE, editor. Edinburg: Churchill Livingstone. Pp: 177 – 200
- Wallace JL., G. Webb McKnight, and Cameron JB. 1995. Adaptation of Rat Gastric mucosa to Aspirin Require Mucosal Contact. *American Physiological Society*. 95: 34 – 138
- Wang Lin, Wang Zengyong, Liu Jianzhu, 2010. *Protective Effect of N-acetylcysteine On Experimental Chronic Lead Nephropotoxicity in Immature Female Rats*. Human and Experimental Toxicology. 29(7) : 581-591.
- Wati, I. P., Aulanni'am., dan C. Mahdi. 2013. Aktivitas Protease dan Gambaran Histologi Ginjal Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Pasca Induksi Cyclosporin-A. *Student Journal Kimia. Brawijaya University*. 1(2): 257-263.
- Weirich N. T., Collins A. M., Williams V. P. 2001. Antioxidant Enzymes in the Honey Bee, *Apis mellifera*. *Apidologie* 33(2002): 3-14
- Widiartini, W., E. Siswati., A. Setiyawati., I.M. Rohmah, E., Pratyoto. 2013. Pengembangan Usaha Produksi Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Tersertifikasi dalam Upaya Memenuhi Kebutuhan Hewan Laboratorium. *Jurnal Fakultas Peternakan Universitas Diponegoro*.
- Widhoretno, D. 2011. Peran Suplementasi Susu Kedelai pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Terpapar Formalin terhadap Aktivitas Enzim Protease,

- Kadar MDA, dan Gambaran Histopatologi Jejunum [Skripsi]. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Brawijaya
- Wilson. 1994. *Patofisiologi Saluran Cerna: Konsep Klinis Proses-Proses Penyakit*. Ad ke-4. Peter Anugrah, penerjemah. Jakarta: Buku Kedokteran ECG. Terjemahan dari: *Pathophysiology, Clinical Concepts of Disease*.
- Winarno, F.G. 1981. Madu Teknologi, Khasiat dan Analisa. Bogor: Pusbangtepa Halaman 25-26.
- Wolfensohn, S., dan Lloyd, M., 2013, *Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare*, 4th ed., Wiley-Blackwell, West Sussex, 234



